

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
Keemia Instituut

Katrin Kalind

**ISOKINOLIINIL PÕHINEVAD BISUBSTRAATSED  
INHIBIITORID PROTEIINKINAASIDELE**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Darja Lavõgina, *PhD*

Asko Uri, *PhD*

Tartu 2013

# SISUKORD

|  |    |
|--|----|
| SISUKORD .....   | 2  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....   | 3  |
| 1. SISSEJUHATUS .....  | 5  |
| 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....   | 7  |
| 2.1 Proteiinkinaasid .....   | 7  |
| 2.1.1 Proteiinkinaasidest üldiselt .....   | 7  |
| 2.1.1 AGC-rühma proteiinkinaasid .....   | 7  |
| 2.1.2 PKA .....  | 8  |
| 2.1.3 ROCK .....   | 10 |
| 2.1.4 Kinaaside PKA ja ROCK katalüütilised domäänid .....  | 11 |
| 2.2 Ensüümide inhibiitorid .....   | 13 |
| 2.2.1 Ensüüminhibiitoritest üldiselt .....   | 13 |
| 2.2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid .....   | 14 |
| 2.2.2.1 ATP-sidumistaskusse seostuvad inhibiitorid .....   | 14 |
| 2.2.2.2 Valksubstraaditaskuga seostuvad inhibiitorid .....   | 16 |
| 2.2.2.3 Bisubstraatsed inhibiitorid .....  | 17 |
| 3. REAGENTIDE, APARATUURI JA MEETODITE KIRJELDUS .....   | 20 |
| 3.1 Kasutatud reagensid ja aparatuur .....   | 20 |
| 3.1.1 Reagensid .....  | 20 |
| 3.1.2 Aparatuur .....  | 20 |
| 3.1.3 Tahkefaassüntees .....   | 20 |
| 3.1.3.1 Kaiseri test .....   | 23 |
| 3.1.4 Biokeemilised mõõtmised .....  | 24 |
| 3.1.4.1 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev sidumis-<br>/väljatõrjumismeetod (FA) .....                      | 24 |
| 3.1.4.2 ARC-Lum sondide fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev<br>sidumis-/väljatõrjumismeetod (LUM) ..... | 25 |
| 4. EKSPERIMENTAALNE OSA .....  | 27 |
| 4.1 Süntees .....  | 27 |
| 4.1.1 H9 süntees .....   | 27 |
| 4.1.2 H9 ja N-Boc-2,2' - iminodietaanhapest koosneva fragmendi süntees .....   | 27 |
| 4.1.3 ARC-ühendite süntees .....   | 28 |
| 4.2 Biokeemilised mõõtmised .....  | 29 |
| 4.2.1 FA-meetod .....  | 29 |
| 4.2.2 LUM-meetod .....   | 29 |
| 5. TULEMUSTE ANALÜÜS .....   | 31 |
| 5.1 Tulemuste üldine kirjeldus .....   | 31 |
| 5.2 Inhibiitorite süntees .....  | 31 |
| 5.3 Sünteesitud inhibiitorite biokeemiline iseloomustamine .....   | 32 |
| 5.4 LUM mõõtmismeetodi modifitseerimine kõrge afiinsusega ühendite<br>iseloomustamiseks .....                          | 34 |
| 5.5 Võimalikud arengusuunad .....  | 36 |
| 6. KOKKUVÕTE .....   | 37 |
| 7. SUMMARY .....   | 38 |
| 8. TÄNUAVALDUSED .....   | 40 |
| 9. KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....  | 41 |
| 10. LISAD .....  | 48 |

## KASUTATUD LÜHENDID

| <i>Lühend</i> | <i>Ingliskeelne nimetus</i>  | <i>Eestikeelne nimetus</i>  |
|---------------|--|---|
| Abu           | 4-aminobutanoic acid residue   | 4-aminobutaanhappe jääk   |
| Adc           | adenosine-4'-dehydroxymethyl-4'-carboxylic acid moiety                           | adenosiin-4'-dehüdoksümetüül-4'-karboksüülhappe jääk                              |
| AH            | amino acid residue   | aminohappe jääk   |
| Ahx           | 6-aminohexanoic acid residue   | 6-aminoheksaanhappe jääk  |
| AMTH          | 5-(2-aminopyrimidin-4-yl)-thiophene-2-carboxylic acid moiety                     | 5-(2-aminopüriminiin-4-üül)-tiofeen-2-karboksüülhappe jääk                        |
| Apr           | 3-aminopropionic acid residue  | 3-aminopropaanhappe jääk  |
| ARC           | adenosine analogue-oligoarginine conjugate                                       | adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat                                   |
| ATP           | adenosine-5'-triphosphate  | adenosiin-5'-trifosfaat   |
| Boc           | <i>tert</i> -butoxycarbonyl  | <i>tert</i> -butoksükarbonüül   |
| cAMP          | cyclic adenosine-3',5'-monophosphate   | tsükiline adenosiin-3',5'-monofosfaat   |
| cGMP          | cyclic guanosine-3',5'-monophosphate   | tsükiline guanosiin-3',5'-monofosfaat   |
| DCE           | 1,2-dichloroethane   | 1,2-dikloroetaan  |
| DIC           | <i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide   | <i>N,N'</i> -diisopropüülkarbodiimiid   |
| DIEA          | diisopropylethylamine  | <i>N,N</i> -diisopropüületüülamiin  |
| DMF           | <i>N,N</i> -dimethylformamide  | <i>N,N</i> -dimetüülformamiid   |
| DMSO          | dimethylsulfoxide  | dimetüülsulfoksiid  |
| FA            | fluorescence anisotropy  | fluorestsentsi anisotroopia   |
| Fas           | 5-(1,4-diazepane-1-sulfonyl)isoquinoline   | 5-(1,4-diasepaan-1-sulfonüül)isokinoliin  |
| Fmoc          | 9-fluorenylmethoxycarbonyl   | 9-fluorenüülmetoksükarbonüül  |
| GDP           | guanosine-5'-diphosphate   | guanosiin-5'-difosfaat  |
| GTP           | guanosine-5'-triphosphate  | guanosiin-5'-trifosfaat   |
| H9            | <i>N</i> -aminoethyl-5-isoquinolinesulfonamide                                   | <i>N</i> -aminoetüül-5-isokinoliinsulfoonamiid                                    |
| HBTU          | 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate | 2-(1 <i>H</i> -bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat |
| HOBt          | 1-hydroxybenzotriazole   | 1-hüdoksübensotriasool  |
| HPLC          | high-performance liquid  | kõrgefektiivne vedelikkromatograafia  |

|           |  |   |
|-----------|--|---|
|           | chromatography   |   |
| Ida       | 2,2'-iminodiacetic acid moiety   | 2,2'-iminodietaanhappe jääk   |
| IQS       | 5-isoquinolinesulfonic acid moiety   | 5-isokinoliinsulfoonhappe jääk                                      |
| MALDI-TOF | matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectroscopy | lennuaja maatriks-laserdesorptsioonionisatsioon mass-spektroskoopia |
| MLC       | myosin light chain   | müosiini kerge ahel   |
| NMM       | <i>N</i> -methylmorpholine   | <i>N</i> -metüülmorfoliin   |
| Pamb      | 4-(aminomethyl)benzoic acid moiety   | 4-(aminometüül)bensoehappe jääk                                     |
| PH        | pleckstrin homology domain   | plekstriinhomoloogia ala  |
| PK        | protein kinase   | proteiinkinaas  |
| PKA       | cAMP-dependent protein kinase  | cAMP-sõltuv proteiinkinaas  |
| PKAc      | cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit, type $\alpha$               | cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütiline alaühik, tüüp $\alpha$   |
| PKAr      | cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit                             | cAMP-sõltuva proteiinkinaasi regulatoorne alaühik                   |
| PKI       | protein kinase inhibitor peptide   | proteiinkinaasi inhibiitorvalk                                      |
| ROCK      | Rho-associated protein kinase  | Rho-sõltuv proteiinkinaas   |
| SPPS      | solid phase peptide synthesis  | peptiidsüntees tahkel faasil  |
| TFA       | trifluoroacetic acid   | trifluoroetaanhape  |
| TIPS      | triisopropylsilane   | triisopropüülsilaan   |
| $v$       | volume percent   | mahuprotsent  |

## 1. SISSEJUHATUS

Proteiinkinaasid on fosfotransferaaside klassi kuuluvad ensüümid, mille peamiseks funktsiooniks on katalüüsida valkude fosforüülimist. Fosforüülimise käigus toimub  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekanne doonormolekulilt (enamasti ATP-lt, kuid ka teistelt nukleotiididelt [1]), valk- või peptiidsubstraadi seriini-, treoniini- või türosiinijäägi hüdroksüülrühmale [2]. Fosforüülimise tulemusel tekib fosforüülitud aminohappe kõrvalahelasse negatiivne laeng, mis põhjustab substraatvalgu konformatsiooni muutuse [3]. Seega võib antud protsessi vaadelda kui nõ molekulaarset lülitit, mis kaasab või lülitab substraatvalgu välja olulistest rakulistest protsessidest, milleks võib olla rakkude kasv, difentseerumine, apoptoos, geenide transkriptsioon, tsütoskeleti ümberkorraldamine ja rakkude liikumine ning reageerimine rakuvälistele stiimulitele [4,5].

Kõrvalekaldeid proteiinkinaaside normaalsest aktiivsusest (mutatsioonid, üleekspressioon või takistatud rakusisene inhibeerimine) saab siduda mitmete haiguste tekke ja/või arenguga, näiteks vähkkasvajad, diabeet, Alzheimeri tõbi, kõrgvererõhutõbi, immuunpuudulikus ja kesknärvisüsteemi haigused. Seetõttu on proteiinkinaasidest saanud farmaatsiatööstuse oluline sihtmärk ja mitmed teadusrühmad tegelevad kinaaside uurimisega ning kinaaside aktiivsuse reguleerimisele suunatud uute ainete (sealhulgas inhibiitorite) ja aktiivsuse mõõtmist võimaldavate meetodite väljatöötamisega [6–9].

Proteiinkinaasidel on kaks sidumistaskut, millest ühte seostub ATP ja teise valk-/peptiidsubstraat. Enamik praeguseks sünteesitud PK-de inhibiitoritest on ATP-taskusse (ATP-saiti) seonduvad inhibiitorid. ATP-sidumistaskusse seonduvad ühendid peavad sidumiskoha pärast konkureerima rakusisese kõrge (1-5 mM) ATP kontsentratsiooniga. Kuna rakus on lisaks sarnase sidumissaidiga PK-dele rohkem kui 1500 muud ATP-d siduvat valku, esineb alati oht, et inhibiitoril on lisaks soovitud ka lisasihtmärkvalk. Inhibiitorite teiseks, vähemlevinud variandiks, on valksubstraadi-sarnased ühendid, millel võib olla küll kõrgem selektiivsus, kuid suur molekulmass ja kõrge polaarsus piiravad nende kasutamist elusrakkudes ja -kudedes. Üheks võimalikuks lahenduseks samal ajal nii afiinse kui selektiivse ühendi disainil on bisubstraatse inhibiitori kontseptsioon, kus ühes molekulis on nii ATP kui valksubstraadi sidumissaiti seonduvad fragmendid [10,11].

Adenosiini analoogi ja oligo-*D*-arginiini konjugaadid on bisubstraatsete inhibiitorite klassi kuuluvad ühendid, mis koosnevad omavahel paindliku linkeriga ühendatud nukleosiidsest ja peptiidsest osast. Need osad seostuvad vastavalt PK-i ATP- ja valksubstraadi sidumistaskusse. Sobiva disaini korral on võimalik saada kõrge afiinsuse ja/või selektiivsusega bisubstraatseid inhibiitoreid proteiinkinaasidele [12].

Käesoleva töö eesmärkideks on 1) ARC-tüüpi ainete süntees, kus ATP-sidumistaskusse suunatud osaks on 5-isokinoliinsulfoonhappe fragment, ja 2) saadud ühendite afiinsuse määramine cAMP-sõltuva proteiinkinaasi (PKA) ja Rho-sõltuva proteiinkinaasi (ROCK) suhtes, kasutades fluorestsentsi anisotroopia ja aeglahutusega fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinevaid meetodeid, ning inhibiitorite kinaasiselektiivsust mõjutavate struktuurielementide kindlakstegemine. PKA on üks esimesi avastatud ja enim uuritud kinaase, mistõttu kasutatakse seda mudelkinaasina vähemuuritud kinaaside iseloomustamisel [13]. ROCK on seotud aga paljude haigustega, mis muudab ta oluliseks farmakoloogiliseks sihtmärgiks [14]. Seepärast kasutatakse neid kinaase antud töös uurimisobjektidena.

## 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 2.1 Proteiinkinaasid

#### 2.1.1 Proteiinkinaasidest üldiselt

Proteiinkinaasid on valksubstraadi fosforüülimist katalüüsivad ensüümid. Fosforüülimine on fosforüülrühma ülekandmine ATP-lt (doonorilt) valksubstraadi Ser, Thr või Tyr jäägi hüdroksüülrühmale (aktseptorile). Tagamaks protsessi pöörduvat iseloomu, viiakse ensüümide fosfataaside poolt vajadusel läbi ka fosforüüli eemaldamine (ehk defosforüülimine), mille käigus toimub fosforüülrühma ülekandmine veemolekulile. Pöörduv fosforüülimine on eukarüootse raku üks olulisemaid regulatsioonimehhanisme, mis lubab elusrakkudel vastata välistele ja sisemistele stiimulitele [15]. Inimese genoomi järjestamise tulemusena on avastatud 518 PK-i, mida kodeerib umbes 2% kõikidest geenidest [16]. Hiljutise taasjärjestamise tulemusel jäeti loetelust välja 3 ning lisati 23 uut, mis teeb kokku 538 PK-i [17].

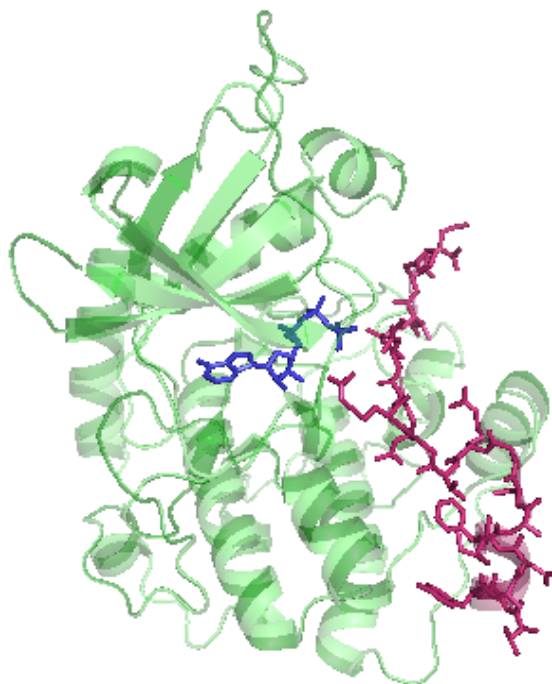
#### 2.1.1 AGC-rühma proteiinkinaasid

AGC-rühm on nime saanud oma kolme esimesena avastatud liikme järgi, millel on katalüütilises alaühikus sarnane aminohappeline järjestus: cAMP-sõltuv PK (PKA), cGMP-sõltuv PK (PKG) ja proteiinkinaas C (PKC) [18]. Kokku on rühmas 60 proteiinkinaasi. AGC-rühma kinaaside aktiivsuseks on vajalikud sekundaarsed vahendajad, milleks on näiteks cAMP, cGMP, Rho perekonna GTPaasid,  $Ca^{2+}$  jne [5].

Praeguseks on määratud mitmete AGC kinaaside kristallstruktuurid [5]. Kinaasi katalüütiline osa (molekulmass umbes 40 kDa) on terves perekonnas ja kinaasidel üldiselt sarnase ruumilise struktuuriga [4,19]. Valk tervikuna on globulaarne, kusjuures saab eristada peamiselt  $\beta$ -lehtedest koosnevat N-terminaalset väiksemat sagarat ja põhiliselt  $\alpha$ -heeliksite moodustunud C-terminaalset suuremat sagarat. Fosforüülimise käigus seostub fosforüülrühma doonoriks olev ATP sagaratevahelisse ATP-sidumistaskusse. Fosforüülitav valksubstraat seostub suurema sagara pinnal asuvale substraadi sidumisalale. Seejuures on aktseptoorset hüdroksüülrühma kandev substraadi AH (Ser või Thr) suunatud sagarate vahele (Joonis 1) [5].

Enamik perekonna liikmetest on basofiilsed seriin/treoniin PK-d, mis tähendab, et nende poolt fosforüülitavas valksubstraadis paiknevad aktseptoorse Ser või Thr jäägi lähedal eelistatult aluselised AH-d (st Arg ja Lys). Näiteks PKA substraatidele on fosforüülimissaidis iseloomulik aminohappeline järjestus Arg-X-Ser/Thr või Arg-Arg/Lys-X-Ser/Thr-Leu/Ile ning ROCK-i substraatidele Arg/Lys-X-Ser/Thr või Arg/Lys-X-X-Ser/Thr, kus X tähistab ükskõik mis aminohapet (Tabel 1) ning Ser/Thr on fosforüülitav AH. Lisaks on PKA

substraatide puhul oluline Arg positsioonides (P-6), (P-3) ja/või (P-2) [20–22]. Tänu sarnasele aminohappelisele järjestusele substraatide fosforülimistsentris, võivad mõned AGC kinaasid fosforüülda samu substraate [5].



**Joonis 1.** Kristallstruktuur ATP (tumesinine) ja proteiinkinaasi inhibiitorvalgu PKI fragmendi (tumeroosa) (PKI aminohapped 5-24) seostumisest PKA katalüütilisele alaühikule (roheline). ATP seostub ATP-sidumistaskusse ja PKI substraadi sidumistaskusse (Protein Data Bank (PDB) kood: 1ATP).

**Tabel 1.** Kinaaside PKA ja ROCK valksubstraadide fosforülimissaitide eelistatud aminohappelised järjestused [20–22].

| AH positsioon    | H <sub>2</sub> N- | P-6         | P-3         | P-2     | P-1 | P0      | P+1         | -COOH |
|------------------|-------------------|-------------|-------------|---------|-----|---------|-------------|-------|
| PKA substraadid  |                   | Arg         | <i>n.d.</i> | Arg     | X   | Ser/Thr | <i>n.d.</i> |       |
|                  |                   | <i>n.d.</i> | Arg         | Arg/Lys | X   | Ser/Thr | Leu/Ile     |       |
| ROCK substraadid |                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> | Arg/Lys | X   | Ser/Thr | <i>n.d.</i> |       |
|                  |                   | <i>n.d.</i> | Arg/Lys     | X       | X   | Ser/Thr | <i>n.d.</i> |       |

X tähendab ükskõik mis aminohapet. Positsioon P0 vastab fosforülitavale aminohappejäägile. Miinus tähendab N-terminaali poolset ja pluss C-terminaali poolset aminohappejääki fosforülitava AH suhtes. *n.d.* – *not defined*, määratlemata.

Järgnevalt on lähema käsitluse all kaks antud tööga seotud kinaasi: cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A (PKA) ja Rho-sõltuv proteiinkinaas (ROCK).

### 2.1.2 PKA

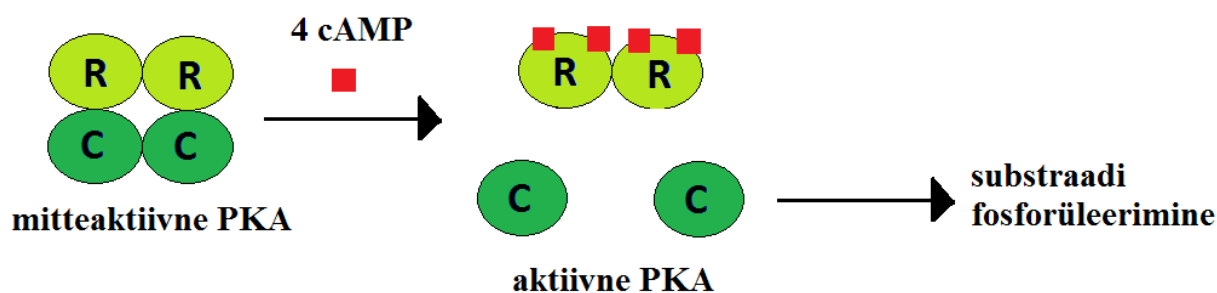
PKA on üks esimesena avastatud [23] ja paremini tuntud ning uuritud PK-e, eeskätt tänu oma selgele aktivatsioonimehhanismile ning struktuursele sarnasusele teiste kinaasidega [22]. Kuna PKA on organismis üldlevinud ja seotud mitmete erinevate signaaliradadega, omab ta mitmeid funktsioone. Nendeks on näiteks aktiini tsütoskeleti destabiliseerimine ja F-aktiini



dünaamika, lipolüüs rasvkoos,ioonjuhtivuse regulatsioon, südamelihaste relakseerumine ning antigeen-indutseeritud B- ja T-rakkude aktivatsioon [24–26].

PKA-d kasutatakse ka mudelkinaasina PK-de uuringutes. Tal on mitmeid struktuurseid sarnasusi teiste kinaasidega (nt globulaarne kahesagaraline tertsiaarstruktuur, katalüüsiks oluliste AH tüüp ja järjestus, fosforüülrühma doonori ning aktseptori sidumissaitide asukoht). Lisaks on PKA sisaldus kudedes suhteliselt kõrge ning selle rekombinantne vorm kergesti ekspresseeritav (nt bakterites), mistõttu PKA-d saab eraldada kõrge saagisega [22,27]. Heade kristallisatsiooniomadustega PKA-d kasutatakse ka aminohappejärjestuse poolest sarnaste PK-de modelleerimiseks, mille saamine, puhastamine ja/või kristalliseerimine on raskendatud (nt Aurora kinaasid). Selleks, et PKA sarnaneks võimalikult palju modelleeritava kinaasiga, viiakse PKA aminohappelisse järjestusse sisse punktmutatsioonid [28].

Mitteaktiivses olekus on PKA sisuliselt neljast valgumolekulist moodustunud kompleks (nn holoensüüm), mis koosneb kahest katalüütilisest (PKAc) ja kahest reguleerivast alaühikust (PKAr). PKA aktiveerimiseks on vajalik tsükliline adenosinmonofosfaat (cAMP)<sup>1</sup>. cAMP-i molekulid seostuvad PKA reguleerivate alaühikutega (mõlemal reguleerival alaühikul on 2 cAMP-i sidumissaiti, seega seostub kokku 4 molekuli cAMP-i). Sellega kaasneb PKAr konformatsiooni muutus ning väheneb PKAr afiinsus PKAc suhtes. Tulemusena dissotseerub holoensüüm reguleerivate alaühikute dimeeriks (kumbki alaühik endiselt seotud 2 cAMP molekuliga) ja kaheks PKAc alaühikuks. PKAc alaühikud on katalüütiliselt aktiivsed ja saavad fosforüülda valksubstraati Ser ja/või Thr jääke (Joonis 2) [13].



**Joonis 2.** PKA aktiveerimine cAMP molekulide seostumise teel.

Katalüütilisel alaühikul on mitmeid substraate ning PKA-spetsiifilised sihtmärgid sõltuvad raku tüübist ning sellest, millised valgud on ekspresseeritud teatud rakuosas rakutsükli teatud staadiumis. PKAc substraatideks on näiteks glükogeeni fosforülaasi kinaas [29], glükogeen süntaas [30], fosfofruktokinaas II [31], proteiinfosfataasi inhibiitor I [32], CREB [33] jne.

cAMP-PKA rada, nagu ka teised rakusisesed signaalirajad, peab spetsiifilisuse säilitamiseks omama ranget ajalist ja ruumilist kontrolli rakutasandil. Rakus tekivad justkui signaalisõlmed,

<sup>1</sup> cAMP kaudu on PKA rada ühendatud G-valguga seotud retseptorite rajaga, mis illustreerib hästi võimalust, kuidas kinaasid võivad vahendada signaaliülekannet raku väliskeskkonnast raku sisemusse.

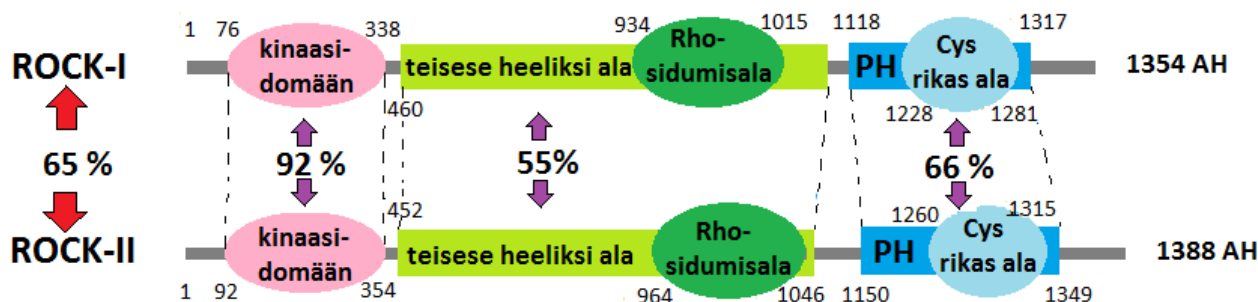
mis ühendavad endas cAMP-i tootjaid (adenülaadi tsüklaas), cAMP-i lagundajaid (fosfodiesteraasid kontrollivad ja piiravad cAMP-i kontsentratsiooni ning jaotust rakus), cAMP-i tarbijaid (PKA), PKA lokalisatsiooni eest vastutavaid valke (nn A-kinaasi ankurdavad valgud) ning kinaasi liigset laienemist pidurdavaid fosfataase. Üks sõlm saab sisuliselt funktsioneerida sõltumatult teisest ning seetõttu võib rääkida ruumilisest lahtusest rakutasandil [34].

### 2.1.3 ROCK

ROCK on AGC grupi seriin/treoniin-kinaas, mida aktiveerivad Rho-perekonna väikesed GTPaasid (nt Rho). ROCK on oluline rakkude kasvu, migratsiooni, metabolismi ja apoptoosi regulaator, mis toimib läbi aktiini tsütoskeleti moodustumise [14,35]. Uuringud on näidanud, et kõrvalekalded ROCK-i normaalsest aktiivsusest on seotud haigustega, mis tulenevad rakkude võimetusest relakseeruda. Nendeks on mitmed kardiovaskulaarsed haigused, näiteks kõrgvererõhutõbi, südame pärgarteri ja aju vasospasm, ateroskleroos, infarkt ning südamepuudulikkus [36].

ROCK-il on kaks isovormi, ROCK-I (ehk Rho-kinaas  $\beta$  ehk ROK $\beta$ ) ja ROCK-II (ehk Rho-kinaas  $\alpha$  ehk ROK $\alpha$ ), mõlemad molekulmassiga umbes 160 kDa. ROCK-I ja ROCK-II struktuur on väga sarnane. See koosneb N-terminaalsest kinaasidomäänist, keskel asuvast teisese heeliksi alast (ing.k. *coiled-coil domain*) ja C-terminaalsest plekstriinhomoloogia alast (PH). Teisese heeliksi ala interakteerub teiste valkude  $\alpha$ -heeliksiga ning see sisaldab ka Rho-seostumisala. PH osaleb valgu lokaliseerimisel rakus ning PH jagab kaheks osaks tsüsteiinirikas ala [14,37]. Mitteaktiivses olekus on PH ja Rho-sidumisala seostunud sama valgumolekuli N-terminaalsesse piirkonda. ROCK-i muudab aktiivseks Rho seostumine (vt allpool) ning sellele järgnev kinaasi kinnitumine plasmamembraanile [37,38].

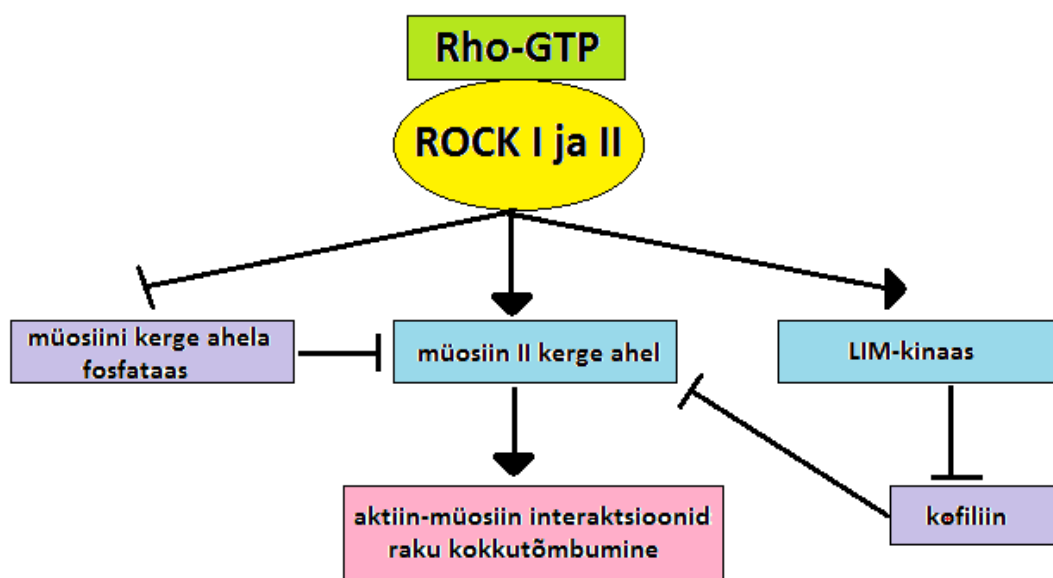
ROCK isovormide üldine aminohappeline järjestus on 65% ulatuses identne, kusjuures kinaasidomään on homoloogiline 92% ulatuses (Joonis 3). Kuna isovormide kinaasidomäänid on väga sarnased, arvatakse, et isovormide selektiivseid inhibiitoreid pole võimalik saada [39].



Joonis 3. ROCK-i isovormide, ROCK-I ja ROCK-II struktuur ja aminohappeline järjestuse sarnasus [39].

Nii nagu PKA on cAMP-signaaliraja esindaja, on ROCK Rho-raja esindaja. Rho on suhteliselt väikese molekulmassiga valk (molekulmass 21-25 kDa [40]), mis on GDP-ga seotuna mitteaktiivne (Rho-GDP) ja GTP-ga seotuna aktiivne (Rho-GTP). Vastusena rakuvälisele mõjutajale transporditakse Rho-GDP plasmamembraani lähedale ning muudetakse aktiivseks Rho-GTP vormiks. Aktiveeritud Rho-GTP saab seostuda ROCK-iga, mille tulemusel muutub kinaas aktiivseks [14,41,42].

ROCK-il on rakus rohkem kui 20 senikirjeldatud substraati, millest enamik on aktiini tsütoskeleti regulatsiooniga seotud valgud [43]. Peamisteks ROCK-i substraatideks rakus on müosiin II kerge ahel (MLC) ja müosiini kerge ahela fosfataas. MLC fosforüülimise tulemusel seostub see paremini aktiiniga ning toimub raku kokkutõmbumine. Müosiini kerge ahela fosfataasi fosforüülimisel ROCK-i poolt väheneb aga fosfataasi aktiivsus, mille tulemuseks on jällegi suurenenud MLC fosforüülimine. Lisaks on ROCK-i substraadiks LIM-kinaas, mille ülesandeks on fosforüülda aktiini depolümeriseerivat kofilini. Kofilini fosforüülitud vorm on mitteaktiivne (Joonis 4). Kokkuvõttes viib kõigi eespool käsitletud kolme valksubstraadi fosforüülimine ROCK-i poolt aktiinifilamentide tekkimiseni [14,37,44].



**Joonis 4.** ROCK-i substraatide ehk müosiin II kerge ahela, müosiini kerge ahela fosfataasi ja LIM-kinaasi seos aktiini tsütoskeleti regulatsioonis. Tavaline nool näitab, et fosforüülimine muudab substraadi aktiivseks, tõmbi otsaga nool näitab vastupidiselt mitteaktiivseks muutumist. Kõigi kolme Rho-kinaasi substraadi fosforüülimise koosmõjul suureneb raku kokkutõmbumine.

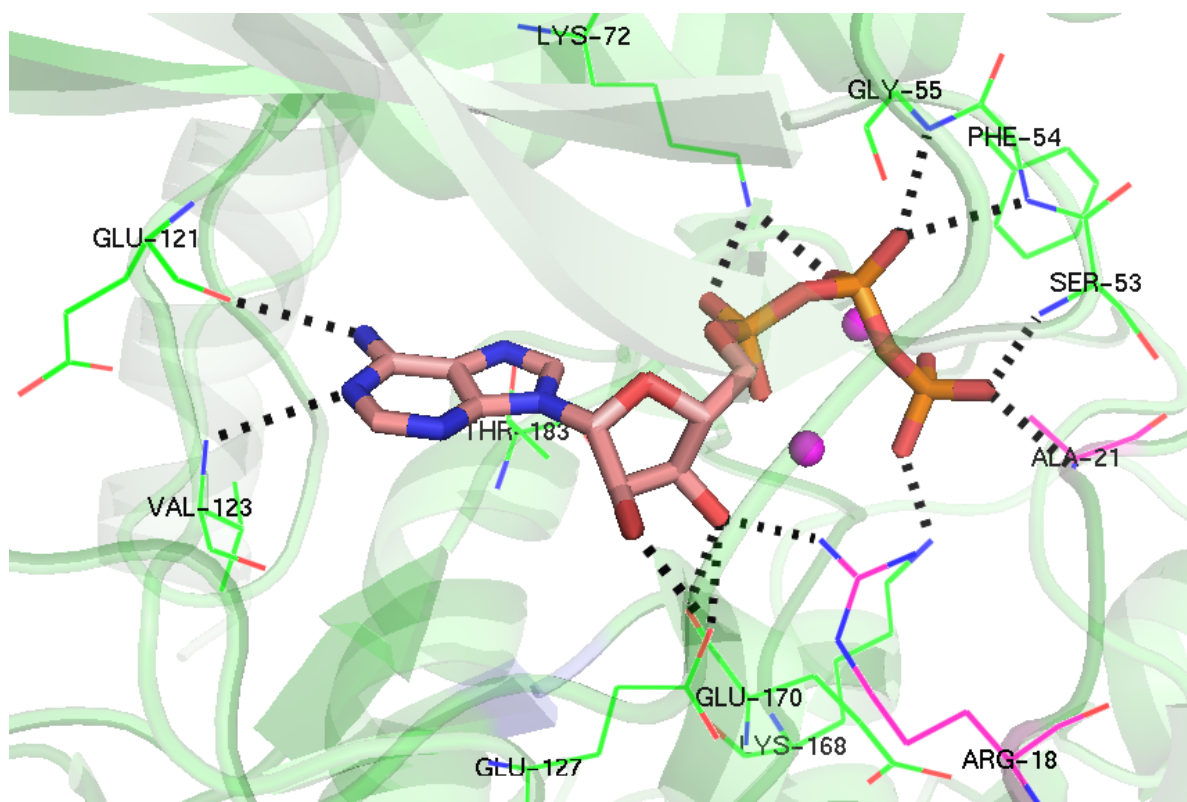
#### 2.1.4 Kinaaside PKA ja ROCK katalüütilised domäänid

Kuigi kinaasi katalüütiline domään on terves PK-de perekonnas ja kinaasidel üldiselt sarnase kahesagaralise ruumilise struktuuriga, on ATP, valksubstraatide ning inhibiitorite seostumismustrid ja vastavad kinaasi saidid mõnevõrra erinevad [45].

PKA ja ROCK on lähedased AGC rühma kinaasid ning seetõttu omavad sarnast katalüütilise domääni aminohappelist järjestust ja struktuuri [46]. Kristallstruktuuride uuringud on

näidanud, et inhibiitorite PKA- ja ROCK-selektiivust mõjutab peamiselt ATP-sidumissaidi erinev struktuur. PKA ja ROCK-i ATP-sidumistaskud erinevad kõige silmapaistvamalt nelja aminohappejäägi poolest: **Leu49** (ROCK-il **Ile**), **Val123** (ROCK-il **Met**), **Glu127** (ROCK-il **Asp**) ja **Thr183** (ROCK-il **Ala**)<sup>2</sup> [47,48].

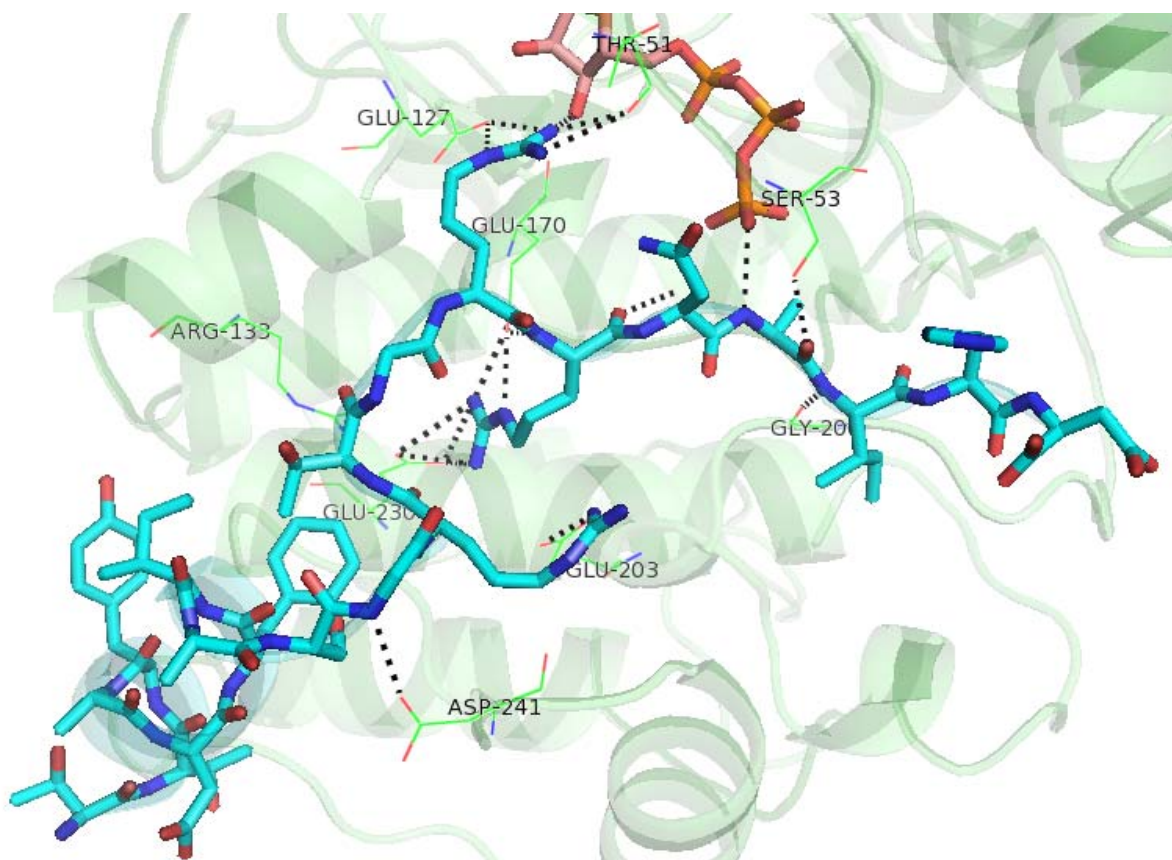
ATP-seostumisel PKAc sidumistaskusse tekivad mitmed vesiniksidemed. **Glu121** on adeniini eksotsükliilise lämmastiku (6N) vesiniksideme aktseptor ning **Val123** 1NH vesiniksideme doonor. **Glu127** moodustab vesiniksidemed ATP riboosijäägi 2' ja 3' hüdroksüülrühmaga ning osaleb ka substraadi (P-3) positsioonis oleva arginiini jäägi sidumisel. PKAc valguahelas on kõigile Ser/Thr kinaasidele iseloomulikud aminohappejäägid, mis on PKAc puhul järjekorranumbritega **Asp166**, **Lys168** ja **Asn171** [22,49]. **Lys168** seostub ühega ATP  $\gamma$ -fosfaadi hapnikest ja **Asn171** seob  $Mg^{2+}$ iooni, mis on kontaktis ATP  $\alpha$  ja  $\beta$  fosfaatrühmadega.  $\alpha$  ja  $\beta$  fosfaatrühmaga seostub ka **Lys72**, mida positsioneerib **Glu91**. **Asp184** seob teise  $Mg^{2+}$ iooni, mis on kontaktis  $\beta$  ja  $\gamma$  fosfaatrühmaga. **Ser53** moodustab vesiniksideme  $\gamma$ -fosfaadiga ning osaleb fosforüülrühma ülekandmises doonorilt substraadile. Lisaks vastutab **Ser53** pärast ATP seostumist aktiivtsentri struktuuri muutuse eest, soodustades sellega substraadi seostumist (Joonis 5) [22].



**Joonis 5.** Kristallstruktuur ATP seostumisest PKAc ATP-sidumistaskusse. Joonisel on näidatud ATP ja kinaasi (toodud rohelistes joontena koos järjekorranumbriga PKAc valguahelas) ning ATP ja PKI (toodud roosates joontena koos järjekorranumbriga PKI fragmendis) aminohappejääkide vahelised vesiniksidemed (must punktiirjoon). Tumulillaga on märgitud  $Mn^{2+}$  ioonid (PDB kood: 1ATP).

<sup>2</sup> Töös on läbivalt kasutatud PKAc-le vastavat aminohappejääkide nummerdust.

Basofiilsete kinaaside valksubstraadi sidumissait sisaldab substraadi arginiinijääkidega seostuvaid happelisi aminohappejääke. Lisaks aitavad need AH-d siduda ka fosforüülrühma doonorit ATP-d. PKAc puhul seovad substraadi positsioonis (P-2) paiknevat arginiinijääki *Glu170* ja *Glu230* ja positsioonis (P-6) paiknevad arginiinijääki *Glu203*. *Glu127* seob substraadi (P-3) positsioonis asuvat Arg ning seostub ka riboosi 2'- ning 3'- hüdroksüülrühmaga. *Leu198*, *Phe202* ja *Leu205* tekitavad substraadi positsioonis (P+1) paiknevale hüdrofoobsele AH hüdrofoobse sidumistasku. *Gly200* moodustab substraadi fosforüülitava AH (positsioon P0) amiidiga vesiniksideme (Joonis 6). Selline vastasmõjude võrgustik lubab kinaasil ära tunda nii valksubstraate kui ka substraadi-konkurentseid inhibiitoreid [22].



**Joonis 6.** Kristallstruktuur PKA loodusliku inhibiitori PKI seostumisest PKAc substraadi sidumistaskusse. Joonisel näidatud PKI ja kinaasi aminohappejääkide (toodud joontena koos järjekorranumbriga PKAc valguahelas) vahelised vesiniksidemed (must punktiirjoon) (PDB kood: 1ATP).

## 2.2 Ensüümide inhibiitorid

### 2.2.1 Ensüüminhibiitoritest üldiselt

Ensüüminhibiitor on ühend, mis seostudes ensüümiga takistab keemilist reaktsiooni ja vähendab selle toimumise kiirust. Ensüümide inhibiitoreid kasutatakse nii *in vitro* kui *in vivo* süsteemides ensüümide aktiivsuse vähendamiseks ning nende funktsioonide täpsemaks uurimiseks.

Inhibiitoreid saab jagada erinevatesse klassidesse päritolu (looduslikud, sünteetilised), seostumise iseloomu (pöörduvad, pöördumatud) ja seostumise kineetilise mehhanismi (konkurentsed, ebakonkurentsed, segakonkurentsed) alusel.

## 2.2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid

PK-de poolt läbiviidava fosforüülrühma ülekandmiseks ATP-lt valksubstraadile on tarvilik mõlema, nii ATP kui substraadi, seostumine. Reaktsiooni on võimalik otseselt takistada, blokeerides ATP- ja/või substraadi sidumistasku. Vastavalt sellele, millise ensüümi osaga inhibiitor seotub, jagunevad PK-de inhibiitorid ATP-saitseteks, substraaditaskuga seostuvateks, allosteerilisteks ja bisubstraatseteks.

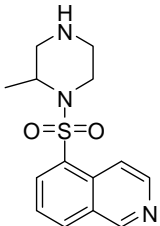
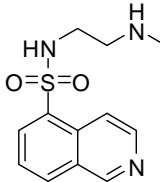
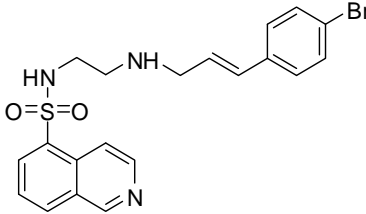
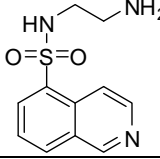
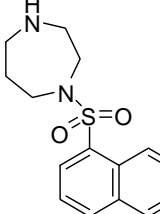
### 2.2.2.1 ATP-sidumistaskusse seostuvad inhibiitorid

Enamik sünteesitud PK-de inhibiitoritest on ATP-saitsed inhibiitorid. ATP-saitsed inhibiitorid seostuvad PK aktiivtsentris olevasse ATP-sidumistaskusse. Kõige lihtsamateks sellisteks inhibiitoriteks on ATP analoogid adenosiindifosfaat (ADP), adenosiin ja adeniin. ATP-saitsed inhibiitorid peavad olevama piisavalt afiinsed, et konkureerida rakusisese kõrge ATP kontsentratsiooniga (2-10 mM) [50]. Taoliste inhibiitorite võimalikuks puuduseks peetakse ka vähest selektiivsust, kuna lisaks PK-dele on rakus rohkem kui 1500 samuti ATP-d siduvat valku [51]. Praeguseks on tehtud kindlaks, et ATP-sidumistasku aminohappeline järjestus võib erinevatel proteiinkinaasidel varieeruda. Tänu sellele on suudetud suurendada inhibiitorite selektiivsust kindlale kinaasile või kinaasi klassile [52].

ATP-saitsete inhibiitorite hulka kuuluvad näiteks Hidaka ehk H-seeria inhibiitorid. H-seeria inhibiitorid sisaldavad sulfonüülrühma ja aromaatsset süsteemi ning jagunevad kahte klassi: 5-isokinoliinsulfonüül- ja naftaleensulfonüülühendid. Algselt sisaldasid H-seeria inhibiitorid naftaleensulfonüülrühma fragmenti ning neid arendati kui kalmoduliini inhibeervaid ühendeid [53]. Uuringute käigus asendati naftaleensulfonüül 5-isokinoliinsulfonüülrühmaga ning saadi hoopis ATP-saitsed proteiinkinaaside inhibiitorid [54]. Esimesteks nende seas olid PKC inhibiitor H7 ehk 1-(5-isokinoliinsulfonüül)-2-metüülpiperasiin ja PKA ning PKG inhibiitor H8 ehk [(2-metüülamino)etüül]-5-isokinoliinsulfoonamiin. H8 derivatiseerimisel saadi afiinne ( $K_i = 0.05 \mu\text{M}$ ) ja selektiivne PKA inhibiitor H89, mida on palju kasutatud PKA uurimisel [55,56]. H8-st lähtub ka *N*-(2-aminoetüül)-5-isokinoliinsulfoonamiid ehk H9, mis inhibeerib mitmeid PK-e ja pole selektiivne [57]. Hidaka inhibiitorite hulka kuulub ainus kliinilisse kasutusse jõudnud ROCK-i inhibiitor Fasudil (ehk HA-1077). Fasudil võeti kasutusele 1995. aastal Jaapanis, kus seda rakendatakse aju vasospasmi ravis [6]. Eelnevalt

mainitud Hidaka inhibiitorite struktuurid ja afiinsused osade PK-de suhtes on toodud Tabelis 2.

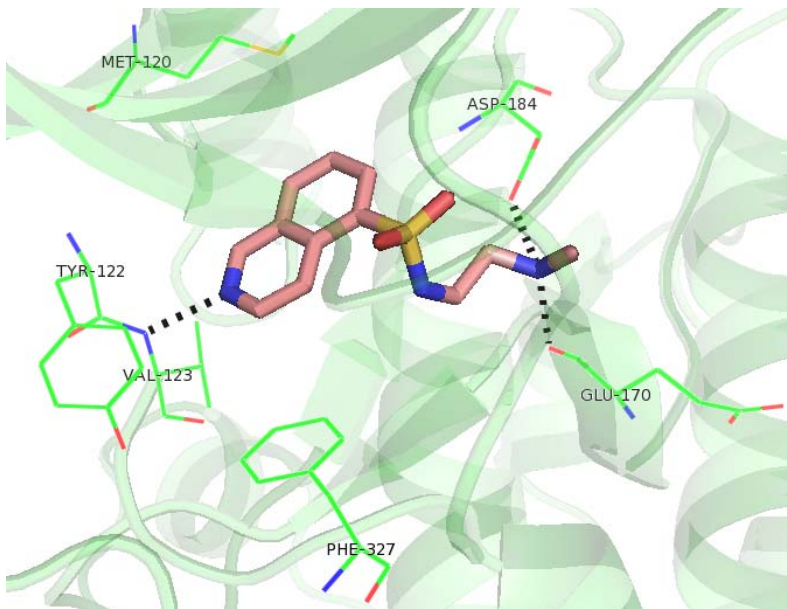
**Tabel 2.** Erinevate isokinoliinsulfonüülühendite inhibeerimiskonstandi  $K_i$  väärtused ( $\mu\text{M}$ ) erinevatele PK-dele [57,58].

| Inhibiitor           | Struktuur   | $K_i$<br>PKA | $K_i$<br>PKG | $K_i$<br>PKC | $K_i$<br>ROCK-II             |
|----------------------|---|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| H7                   |    | 3            | 5.8          | 6            | ap                           |
| H8                   |    | 1.2          | 0.5          | 15           | ap                           |
| H89                  |    | 0.05         | 0.5          | 30           | (IC <sub>50</sub> )<br>0.27* |
| H9                   |  | 1.9          | 0.9          | 18           | ap                           |
| HA-1077<br>(Fasudil) |  | 1.6          | 1.6          | 3.3          | 0.33                         |

Lühendid: ap - andmed puuduvad. \* Mõõtmised on teostatud 0.1 mM ATP juuresolekul.

Isokinoliini fragmendi seostumisel PKAc ATP-saiti tekivad inhibiitori ja kinaasi vahelised interaktsioonid isokinoliiniringi lämmastiku ja **Val123** ning inhibiitori kõrvalahela lämmastiku ja **Glu170** karbonüülrühma vahel [59]. Lisaks saavad ATP-sidumistaskut ümbritsevad aromaatsed (nt **Tyr122**, **Phe327**) ja hüdrofoobse kõrvalahelaga aminohapped (nt **Met120**, **Val123**) moodustada hüdrofoobseid interaktsioone isokinoliini aromaatses süsteemiga (Joonis 7).





**Joonis 7.** Kristallstruktuur H8 seostumisest PKAc ATP-sidumistaskusse. Joonisel on näidatud H8 ja kinaasi aminohappejääkide (toodud joontena koos järjekorranumbriga PKAc valguahelas) vahelised vesiniksidemed (must punktirjoon) ja aminohapped, millega inhibiitor saab moodustada hüdrofoobseid interaktsioone (PDB kood: 1YDS).

Antud töös lähtutakse inhibiitorite disainil ja sünteesil H-seeria inhibiitorist *N*-(2-aminoetüül)-5-isokinoliinsulfoonamiidist ehk H9-st.

#### 2.2.2.2 Valksubstraaditaskuga seostuvad inhibiitorid

Konkreetne PK fosforüülib substraate, mille fosforüülimissaidis on kindel aminohappejärjestus (nn võtmejärjestus). Basofiilsed Ser/Thr kinaasid, mille hulka kuuluvad ka PKA ja ROCK, eelistatult katalüüsivad selliste valksubstraatide reaktsioone, milles fosforüülitava seriini (või treoniini) läheduses on mitmeid positiivselt laetud aminohappejääke. Seda kasutatakse ära substraat-konkurentsete inhibiitorite disainil: peptiidid, mis jäljendavad substraadi aminohappejärjestust, saavad toimida kui substraat-konkurentsed inhibiitorid [60].

Kuna rakusisene valksubstraadi kontsentratsioon on palju väiksem kui ATP kontsentratsioon, annab see substraat-konkurentsetele inhibiitoritele eelise ATP-d jäljendavate inhibiitorite ees. Lisaks muudab ATP seostumine kinaasile ensüümi konformatsiooni, mis koguni soodustab substraadi (või substraaditaskule suunatud inhibiitori) seostumist [61]. Samuti seovad kindla võtmejärjestusega substraati üsna vähesed kinaasid, mistõttu substraaditaskule suunatud inhibiitorid on potentsiaalselt parema selektiivsusega kui ATP-saiti suunatud ühendid [50]. Substraaditaskusse seostuvate inhibiitorite põhiprobleemiks on nende suurus. Inhibiitor peab seostuma kinaasi välispinnale, millega kaasneb vajadus kinaasi pinnal seostumiskohas eemaldada korrastatud veemolekulide kiht (st toimub dehüdratatsioon, mis vajab energiat). Inhibiitori seostumiseks peavad kinaasi ja inhibiitori vahel tekkivad interaktsioonid



kompanseerima dehüdratasiooni energiakulu. Selleks, et uusi interaktsioone inhibiitori ja ensüümi vahel oleks piisavalt palju, peab inhibiitor olema üpris suur. Suur molekul muudab aga problemaatiliseks inhibiitori kasutamise rakkudes: inhibiitor ei saa läbida rakumembraani ja on vähese rakusisese stabiilsusega [10,60]. Stabiilsuse suurendamiseks on sünteesitud peptiidide analooge, nn peptiidomimeetikuid. Peptiidomimeetikutes kasutatakse erinevaid struktuurimuudatusi võrreldes tavaliste peptiididega: näiteks mittekodeeritud aminohappeid (sh *D*-aminohappeid), peptiidsideme analooge (nt tioamiidid), tsükliseerimisi, derivatiseerimisi rasvhapetega jne. Kuna organismis naturaalselt sellise struktuuriga ühendeid ei esine, siis on nad tavaliselt ensümaatilisel raskesti lagundatavad [62]. Käesolevas töös kasutatakse inhibiitorite koostises substraaditaskusse seonduvat oligo-*D*-arginiini fragmenti.

Üks esimesena avastatud substraaditaskusse seostuv inhibiitor on PKI [63]. PKI on looduslik inhibiitor PKA-le, mis omab võtmejärjestust Arg-Arg-Asp-Ala-Leu, kus Ala vastab positsioonile, milles on substraatide puhul fosforülitav AH (PKI seostumine PKAc substraadi sidumistaskusse on kirjeldatud Joonisel 6). See sarnaneb PKA substraatide võtmejärjestusele Arg-Arg/Lys-X-Ser/Thr-Leu/Ile. PKI järjestuses asendab fosforüülrühma aktseptoritalaniini jääk, millel puudub hüdroksüülrühm ning mis seega ei saa vastu võtta ülekantavat  $\text{PO}_3^{2-}$  rühma. Tulemuseks ei toimu fosforüülimist ning kinaas ei saa reaktsiooni katalüüsida [10,60].

#### 2.2.2.3 Bisubstraatsed inhibiitorid

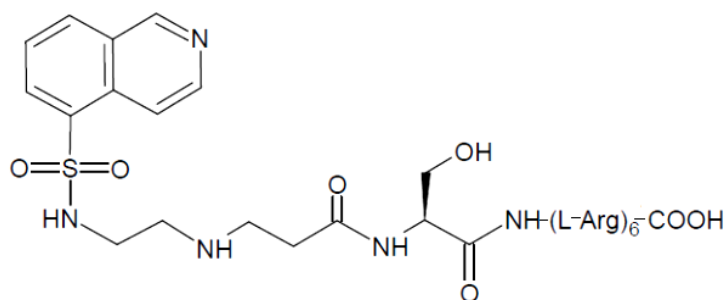
Bisubstraatsed inhibiitorid koosnevad kahest fragmendist ja neid ühendavast linkerist. Seejuures jälgendab üks inhibiitori fragment ATP-d ja seostub PK-i ATP-sidumistaskusse ning teine fragment substraati, seostudes PK-i substraadi sidumistaskusse. Esimesed bisubstraatsed inhibiitorid arendati 1970ndatel aastatel [64,65]. Nendeks olid ensümaatilise vaheoleku-kompleksi jälgendavad inhibiitorid. Sellised inhibiitorid põhinevad kontseptsioonil, et vaheolekus on ensüümi ja substraadi vahel tugevad interaktsioonid, mis kokkuvõtteks viivad katalüüsitava reaktsiooni aktivatsioonienergia vähenemiseni. Seega inhibiitor, mis jälgendab vaheolekut, peab olema võimeline tugevalt seostuma (st omab suurt afiinsust) [66]. Sellised ühendid pole siiski tänapäeval väga laialdaselt levinud.

Bisubstraatsete inhibiitorite arendamine põhineb lähenemisviisil, mille alusel tehakse kindlaks ja ühendatakse fragmendid, millel on ensüümi aktiivtsentris eraldi, kuid siiski lähestikku paiknevad sidumissaidid. Õnnestunud disaini korral säilitavad mõlemad osad oma interaktsioonid ensüümiga [12]. Bisubstraatsete inhibiitorite eeliseks on fragmentide koostoimeline efekt, võrreldes eraldi komponentidega. Kui kaks fragmenti on omavahel sobivalt seotud, võib kombineeritud ühendi afiinsus olla 2-3 suurusjärku suurem kui

individuaalsetel molekulidel (st kui üksikute fragmentide afiinsused jäävad  $\mu\text{M}$  piirkonda, siis nende sobival ühendamisel on võimalik saada nM afiinsusega konjugaat) [67].

Väga oluline on ka fragmente ühendava linkeri struktuur. Kui linker pole optimaalse pikkusega, ei toimu inhibiitori mõlema fragmendi seostumist soovitud kohtadesse ning tegu pole enam bisubstraatse inhibiitoriga. Lisaks peab linker olema piisavalt pikk ja paindlik, et inhibiitori seostumisel jääks ensüümil rohkem võimalusi liikumiseks, mille tulemusel on inhibiitori seostumisel süsteemi entroopiakadu väiksem [68].

Bisubstraatseid inhibiitoreid võib nukleotiidsa osa järgi jagada kolmeks klassiks: ATP peptiidkonjugaadid, adensiini derivaatide peptiidkonjugaadid ja ATP-d jäljendavate inhibiitorite peptiidkonjugaadid. Nukleotiidi peptiidkonjugaadid koosnevad ATP-st, mis on  $\gamma$ -fosfaatrühma kaudu ühendatud peptiidi tiorühmaga [69]. Adensiini derivaatide peptiidkonjugaadid koosnevad adensiinist või selle derivaadist ja peptiidsest osast, mis on erinevalt eelneva klassi esindajatest ühendatud omavahel mittefosfaatse linkeriga [70]. ATP-d jäljendavate inhibiitorite peptiidkonjugaadid saadakse aga adensiini fragmendi asendamisel mõne ATP-konkurentse inhibiitoriga. Sellist lähenemist kasutas esimesena 1991. aastal A. Ricouart'i uurimisrühm. Nad ühendasid isokinoliinsulfoonamiidil põhineva ATP-konkurentse inhibiitori H9 ja heksa-*L*-arginiini peptiidse fragmendi, kasutades linkerina  $\beta$ -alaniini- ja *L*-seriini jääke (Joonis 8). Saadud ühendi afiinsus PKAc suhtes jäi nanomolaarsesse piirkonda ( $K_i = 4 \text{ nM}$ ) [71].

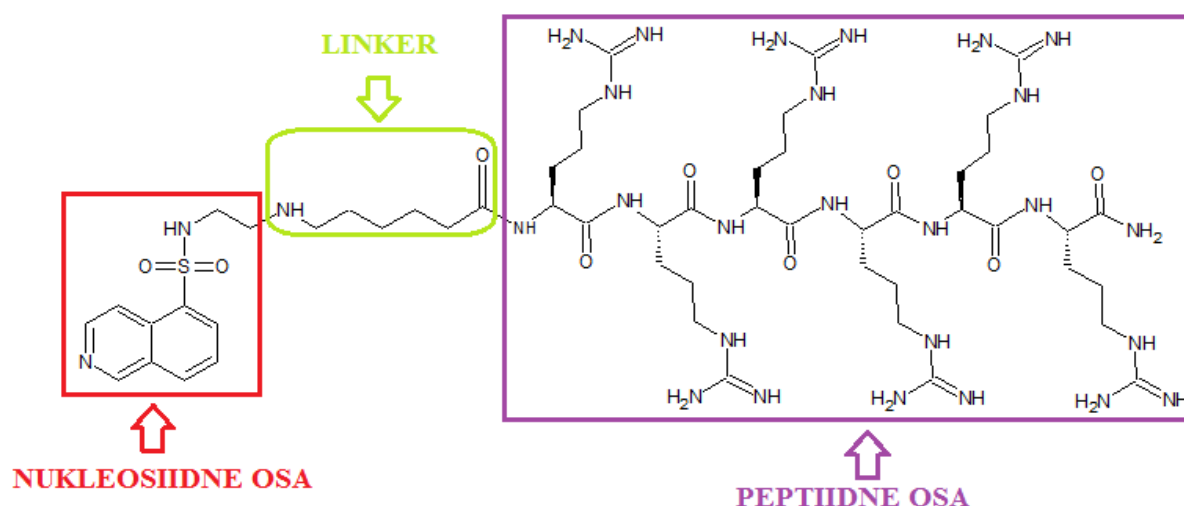


**Joonis 8.** ATP-saitse inhibiitori H9 ja heksa-*L*-arginiini ühendamisel  $\beta$ -Ala ja *L*-Ser koosneva linkeriga saadud bisubstraatne inhibiitor [71].

Üheks kõige rohkem uuritud bisubstraatsete inhibiitorite alaliigiks on adensiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaadid (ARC). ARC-tüüpi inhibiitorid koosnevad adensiini analoogist (adensiini derivaat või ATP-saitse inhibiitor, mis seostub PK-i ATP-sidumistaskusse), oligo-arginiinsest peptiidsest osast (seostub PK-i substraadi sidumistaskusse) ning neid ühendavast ühest või mitmest hüdrofoobsest linkerist (Joonis 9) [12].

ARC-i struktuuris olev oligo-arginiini fragment on oluline inhibiitori selektiivsuse suurendaja basofiilsete PK-de suhtes. Lisaks annab see fragment ARC-dele arginiinirikaste

transportpeptiidide omadused ning seetõttu suudavad nad läbida raku plasmamembraani [72–76].



**Joonis 9.** Adenosiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaadi struktuur. Kinaasi ATP-sidumistaskusse seostuv nukleosiidsne osa on ümbritsetud punase kastiga, kinaasi valksubstraasi taskusse seostuv peptiidne osa violetse kastiga ja neid ühendav hüdrofoobne painduv linker rohelse kastiga. Joonisel on toodud **ARC-903** struktuur.

Üks kõige suuremaid edasiminekuks ARC-ide arendamisel oli peptiidse osa *L*-arginiinijääkide asendamine *D*-isomeeridega. Selline modifikatsioon tõstis kordades ühendite afiinsust PK-dele ning vähendas peptiidse osa rakusisest proteolüütilist degradatsiooni (vt eespool käsitletud peptidomimeetikuid) [77]. Afiinsuse ja selektiivsuse suurendamiseks on ARC struktuuridesse lisatud ka linkereid eraldav kiraalne element (nt *L*-Lys või *D*-Lys) [78]. Kõige paremate ARC inhibiitorite afiinsus jääb madalasse nanomolaarsesse või pikomolaarsesse piirkonda [12,79]. Mõned märkimisväärsed afiinsusega ARC-d on ühendatud fluorestsentsvärviga ning neid kasutatakse sondidena biokeemilistes meetodites (käsitletud allpool) [80–82]. Praeguseks on õnnestunud saada ka kristallstruktuure mitmete ARC inhibiitorite kompleksidest PKA katalüütilise alaühikuga [78,83].

ARC-tüüpi inhibiitorite arenduses on üheks huviaspektiks ka ühendite selektiivsuse muutmine erinevate kinaaside suhtes. ARC-ide afiinsust ja selektiivsust saab kohandada, kasutades erinevaid nukleosiidseid fragmente, linkereid ja/või peptiidset osa [73,78,79]. Lähtudes eri rakenduste vajadustest, on proovitud arendada ja sünteesida võimalikult laia inhabeerimisprofiiliga (saab kasutada nt biokeemilistes meetodites ligandidena) [73,79,81] või, vastupidiselt, võimalikult selektiivseid ühendeid (kasutatakse konkreetse kinaasi uuringutes) [84,85].

Antud töös kasutatakse adenosiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaate, millel varieeritakse H9 ja peptiidse fragmendi vahelise linkeri struktuuri ning pikkust.

### 3. REAGENTIDE, APARATUURI JA MEETODITE KIRJELDUS

#### 3.1 Kasutatud reagensid ja aparatuur

##### 3.1.1 Reagensid

PKAc tüüp  $\alpha$  (rekombinantne veise valk, täisjärjestus) oli Dr Dirk Bossemeyeri (Saksamaa Vähiuuringute Keskus, Heidelberg, Saksamaa) uurimiserühma kingitus. ROCK-II (His<sub>6</sub>-märgistatud rekombinantne inimese valk, AH 11...552) pärines Millipore'ist.

Solvendid oli ostetud Rathburnist ja Flukast. Tahkefaassünteesi resinid ja teised peptiidsünteesi kemikaalid pärinesid järgmistest firmades: Neosystem, Novabiochem, Advanced ChemTech, AnaSpec, Sigma-Aldrich.

##### 3.1.2 Aparatuur

Valmis produktid puhastati vedelikkromatograafiliselt Gerda Raidaru poolt Shimadzu LC Solution (Prominence) HPLC süsteemiga, kasutades Gemini C18 pöördfaas kolonni (5  $\mu$ m, 25 cm×0.46 cm), manuaalset injektorit ja diodireta detektorit (SPD M20A). Elueerimine viidi läbi vesi-atsetonitriili gradiendiga (0.1% TFA) voolukiirusel 1 ml/min. Kõikide eraldatud produktide puhtus oli üle 95% ja elueerimislahused lüofiliseeriti produktide eraldamiseks.

Sünteesitud ühendite massispektrid mõõdeti Erki Enkvisti poolt MALDI-TOF massispektromeetriga Voyager De-Pro (Applied Biosystems). UV-Vis (ultravioletse ja nähtava ala spektroskoopia) spektrite mõõtmiseks ja ühendite kvantifitseerimiseks kasutati NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektrofotomeetrit.

Kõikide sünteesitud inhibiitorite kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga, kasutades H9 ja Fasudili molaarset ekstinktsioonikoefitsienti ( $\epsilon$ ) (323 nm juures  $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Fluorestsentsi anisotroopia ja luminesstsentsi mõõtmised teostati PHERAstar mikroplaadi lugejaga (BMG Labtech), opilisteks mooduliteks vastavalt TAMRA [ex. 540(20) nm, em. 590(20) ja 590(20) nm] ja HTRF [ex. 337(50) nm, em. 675(50) ja 620(20) nm; viivitusaeg (*delay time*) 50  $\mu$ s, signaali kogumisaeg (*acquisition time*) 150  $\mu$ s]. Proovid valmistati tumeda mittesiduva pinnaga 384-süvendilisel mikroplaatidel (Corning, kood 3676). Andmete töötlemiseks ja analüüsiks kasutati tarkvara GraphPad Prism versiooni 5.0 (GraphPad Software, Inc).

##### 3.1.3 Tahkefaassüntees

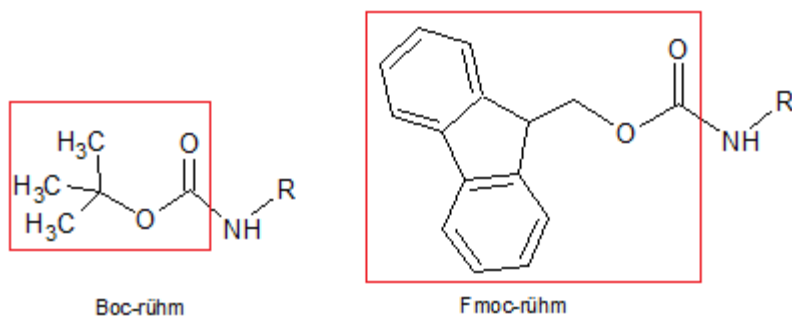
1963. aastal võttis Robert B. Merrifield kasutusele uue peptiidsünteesimeetodi, tahkefaassünteesi (SPPS) [86]. Antud meetodi korral kinnitatakse sünteesitava peptiidiahela

viimane aminohape karboksüülrühmaga (C-terminaaliga) tahke vaigulise kandja ehk resini külge. SPPS korral toimub peptiidi süntees suunas  $C \rightarrow N$  (ehk peptiidi C-terminaalne aminohape ühendatakse vaigu külge esimesena).

Iga järgneva aminohappe lisamine koosneb kolmest etapist:

### 1. eelneva aminohappe N-terminaalse kaitserühma eemaldamine

SPPS-s kasutatakse funktsionaalrühmade kaitseks erinevaid kaitserühmasid. Kaitserühmade esimeseks alaliigiks on need, mis on kinnitatud aminohappe N-terminaali külge; nende eesmärgiks on delokaliseerida terminaalsete aminorühma vaba elektronipaar. See strateegia aitab vältida lisatava aminohappe molekuli reaktsiooni sama aminohappe teiste molekulidega lahuses. Lähtudes N-terminaalsete rühmade kaitsest, on kujunenud kaks peamist sünteesistrateegiat: Fmoc- ja Boc-tahkefaassüntees (Joonis 10). Boc-rühm võetakse maha tugeva happega (tavaliselt TFA), kuid Fmoc-rühma saab eemaldada nõrga aluse keskkonnas (20% piperidiini lahus DMF-s). Fmoc-sünteesi puuduseks on aminohappejääkide  $\alpha$ -süsinike võimalik deprotoneerumine, mille tulemusel tekib AH stereokonfiguratsiooni muutus. Antud töös kasutatakse Fmoc-tahkefaassünteesi.



**Joonis 10.** Fmoc- ja Boc-kaitserühmade struktuurid.

Kui aminohapete kõrvalahelad sisaldavad samuti funktsionaalrühmi (nt karboksüül- ja/või aminorühmad), tuleb ka neid SPPS-i käigus kaitsta, et vältida soovimatute kõrvalreaktsioonide toimumist. Kehtib ortogonaalsuse reegel: N-terminaali ja kõrvalahelate kaitserühmad peavad olema eemaldatavad erinevates tingimustes. Tavaliselt toimub kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamine koos peptiidiahela mahavõtmisega vaigult (vt allpool).

### 2. lisatava aminohappe C-terminaali aktiveerimine

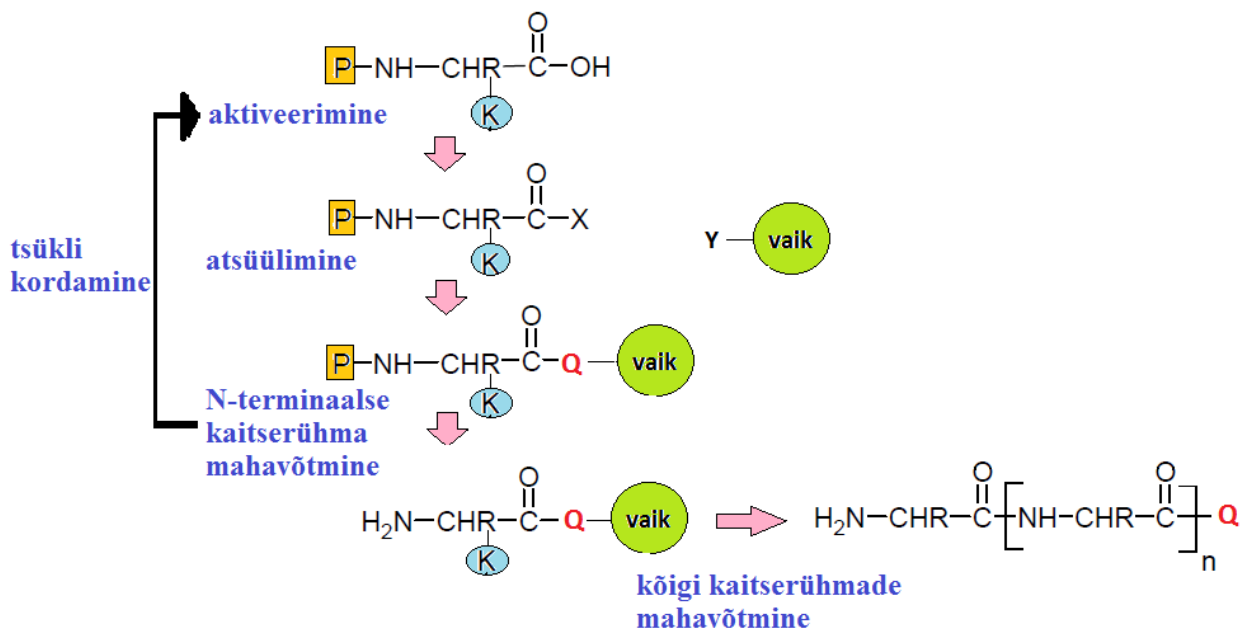
Peptiidsideme teke on kõrge aktivatsioonienergiaga eksotermiline reaktsioon. Seega peab kasutama reaktsiooni toimumist hõlbustavaid reagente, mis muudavad lisatava AH karboksüülrühma elektrofiilsemaks, tõmmates viimase elektrone enda poole. Sellega muudetakse kergemaks kasvava ahela aminorühma atakeerimine. Kõige enam kasutatavad atsüülimisreaktsiooni hõlbustavad reagentid on anhüdriide-moodustavad (nt dialküleeritud

karbodiimiidid) ja aktiivstreid-moodustavad reagentid. Antud töös kasutatakse aktivaatoritena aktiivstreid-moodustavaid reagente HBTU ja HOBt.

### 3. lisatava aminohappe ühendamine (atsüülimisreaktsioon ehk *coupling*)

Tahkefaassünteesis on väga oluline atsüülimisreaktsiooni saagis. Isegi väike hulk mitte-reageerinud reaktsioonitsentriteid nõuab sünteesi käigus: näiteks kui reageerib 95% reaktsioonitsentritest ja järgmise etapi saagis on sama, siis kahe etapi järel on õiget produkti reaktsioonisegus  $0.95 \times 0.95$  ehk umbes 90%. Seetõttu on väga oluline aminohappe lisamine suures ülehulgas (3..10 korda vaigu aktiivsentrите suhtes), et atsüülimisreaktsioon läheks võimalikult lõpuni. Pikkade peptiidiahelate sünteesil, kus steeriline takistus on vältimatu ning osa tsentritest jääb seetõttu reageerimata, kasutatakse pärast iga etappi reageerimata aminorühmade katmist (*capping*) väikese atsüüliiva reagentiga (nt etaanhappe anhüdriid). See takistab ahela edasikasvamist kohtadest, kuhu aminohappe lisamist ei toimunud, ning välditakse olukorda, kus mõned aminohapped on peptiidiahelast välja jäänud.

Sünteesi viimaseks etapiks on valmis peptiidi eemaldamine resinilt koos samaaegse kõrvalahelate kaitserühmade mahavõtmisega. Boc-SPPS korral võetakse valmis ahel vaigult maha veelgi tugevama happega (HF) kui kaitserühmad (TFA); Fmoc-SPPS korral kasutatakse nõrgemat hapet (TFA), sest N-terminaalset kaitserühma eemaldatakse nõrga alusega. Seega on Fmoc-süntees läbiviidav pehmemates tingimustes (Joonis 11).



**Joonis 11.** Tahkefaassünteesi skeem. Tähistused: P - aminohappe N-terminaali kaitserühm; K - aminohappe kõrvalahela kaitserühm; Y - vaiguteraale kinnitatud funktsionaalrühm; X - aktiveeritud aminohappe reageeriv rühm; Q - vaiguteraale kinnitatud funktsionaalrühma Y ja aktiveeritud aminohappe reageeriva rühma X reageerimisel tekkinud side; n - aminohapete arv valmis peptiidis.

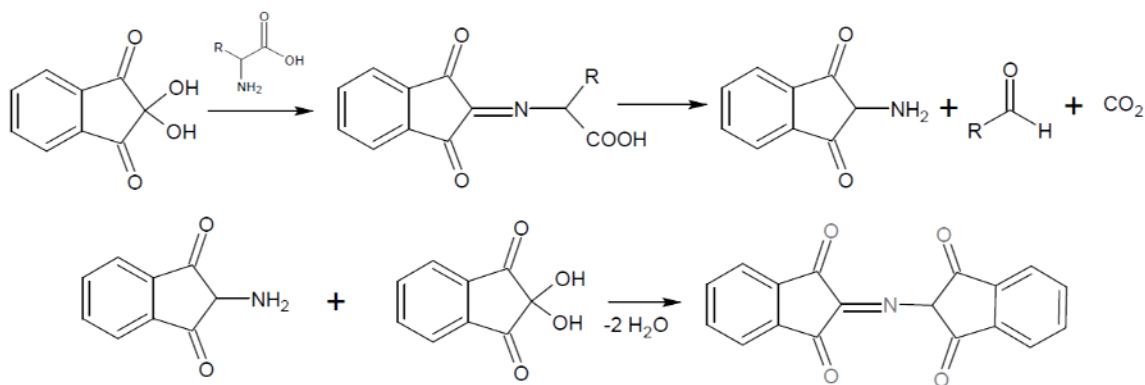
Tahkefaassünteesi edukaks teostuseks on väga oluline õige tahke kandja ja selle parameetrite valimine. Vaigulise kandjana kasutatakse tavaliselt teralise ja poorse ehitusega

divinüülbenseeni abil ristseotud polüstüreeni, mis küll pundub, aga ei lahustu sünteesi käigus kasutatavates solventides. Esimese aminohappe sidumiseks on igale vaigutemale kinnitatud teatud arv funktsionaalrühmi, mis on reaktsioonitsentriteks. Reaktsioonitsentrite arv vaigu massiühiku kohta (*loading*) on määrava tähtsusega: kõrge saagise saavutamiseks peab olema võimalikult suur reaktsioonitsentrite arv, kuid peab vältima kasvavate ahelate poolt põhjustatud steerilist takistust. Lisaks on oluline leida optimaalne vaigu nn pundumise aeg. Pundumise käigus toimub solvendi molekulide difusioon polümeeri ning polümeeri ruumala suurenemine. See soodustab reagentide molekulide liikumist polümeeriahelate vahel.

Tahkefaassüntees on levinuim sünteesimeetod kuni 100 aminohappeliste peptiidide valmistamiseks [87]. Meetodi eelisteks on kiirus, automatiseeritavus, kõrge saagis (kuni 99.8% ühe atsüülimise kohta) ja kerge puhastamine reagentide ülehulgast vaheetappides solventidega pesemise ja filtreerimise teel. Puudusteks on suur reagentide kulu (kiiruse ja saagise tõstmiseks kasutatakse 3...10-kordset reagentide ülehulka vaigu *loadingu* suhtes) ja vaheproduktide keeruline analüüsimine otse vaigult (vaigu osaline eraldamine ja produkti mahavõtmine vähendab saagist). Välja on pakutud erinevaid võimalusi kasvava peptiidiahela uurimiseks otse vaigult [88–90]. Lihtsas peptiidsünteesis kasutatakse nn värviteste, mis näitavad teatud funktsionaalrühma olemasolu või puudumist (nt Kaiseri test: kvalitatiivne, näitab vabade aminorühmade olemasolu, käsitletud allpool). Lisaks kogutakse reaktsioonijärgset lahust, et mõõta reagentide hulga vähenemist või produkti tekkimist (nt Fmoc-test: vaigu kohalt kogutakse pärast piperidiiniga töötlemist lahus, mis sisaldab N-terminaalilt eemaldatud Fmoc-rühma; tekkinud produkt omab iseloomulikku neeldumist UV-alas, tänu millele saab määrata vaigu küljes olevat peptiidi hulka ja reaktsiooni saagist).

#### 3.1.3.1 Kaiseri test

Kaiser testi teostus on kiire ja lihtne. Kasutatakse 5% (w/v) ninhüdrini lahust etanoolis ja 80% (w/v) fenooli lahust etanoolis. Väike hulk pestud vaiguterasid kantakse reaktsioonisegust väikesesse katseklaasi, lisatakse 20 µl mõlemat lahust ning soojendatakse pliidil 105 °C juures 5 min jooksul. Vabade aminorühmade olemasolu korral värvuvad vaiguterasid siniseks (Ruhemanni sinine, Joonis 12) [90]. Vabad aminorühmad võivad vaigu külge jääda, kui atsüülimisreaktsioon pole täielikult lõpuni läinud. Sellisel juhul tuleb korrata atsüülimist või kasutada reageerimata aminorühmade katmist (vt eestpoolt).

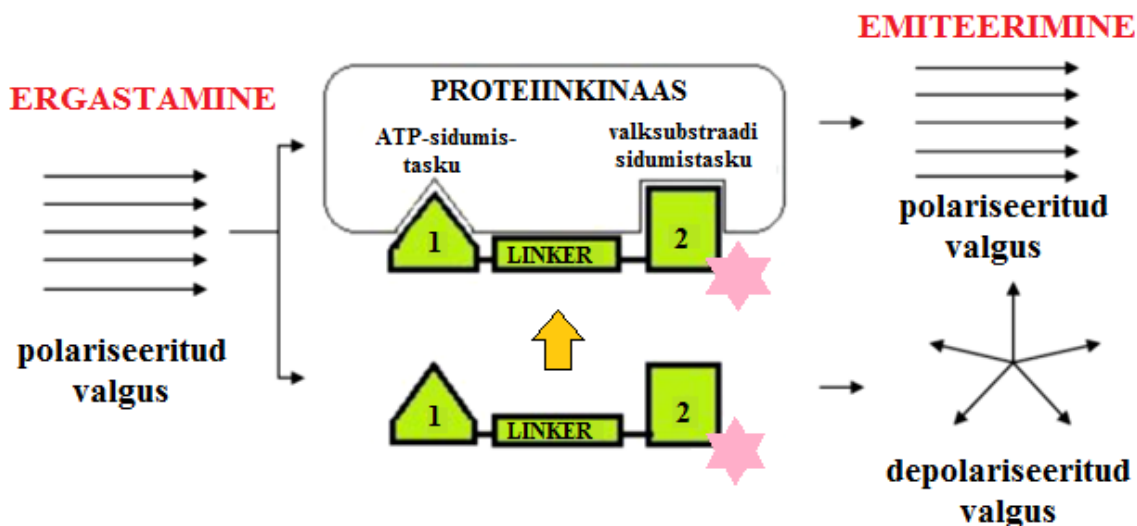


**Joonis 12.** Kaiser testi toimumise mehhanism. Lõpp-produkt muudab vabade aminorühmade korral vaiguterade värvuse lillakassiniseks.

### 3.1.4 Biokeemilised mõõtmised

#### 3.1.4.1 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev sidumis-/väljatõrjumismeetod (FA)

Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev sidumis-/väljatõrjumismeetod (FA) kasutab fluorestsentsligandi sisaldava lahuse polarisatsiooni muutust, mis on põhjustatud ligandi seostumisest suurema molekuliga (kinaasiga) või ligandi väljatõrjumisest selle kompleksist. Analüüsi käigus proov ergastatakse polariseeritud valgusega ja mõõdetakse emiteeritud kiirguse polarisatsiooni määra (anisotroopiat) (Joonis 13). Fluorestsentsligandideks ehk -sondideks võivad olla näiteks fluorestsentsvärviga märgistatud PK inhibiitorid, mille afiinsust saab iseloomustada FA sidumismeetodiga, mõõtes nende seostumist PK-le. Seega lubab FA meetod hinnata inhibiitori afiinsust kinaasile ning erineb kineetilistest meetoditest (kus mõõdetakse ainete inhibeerimispotentsiaali kinaasi poolt katalüüsitava fosforüülimisreaktsiooni määra vähenemise kaudu).



**Joonis 13.** Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhineva sidumis-/väljatõrjumismeetodi skeem. Helerohelise värviga on joonisel kujutatud ARC-inhibiitorist fluorestsentssondi, milles nr 1 tähistab nuklosiidset ja nr 2 peptiidset osa ning roosa täheke kujutab fluorofoori.



FA meetod jaguneb kaheks alaliigiks: sidumis- ja väljatõrjumismeetod. Esimesel juhul seostub väikese molekulmassiga (1.5...2 kDa) fluorestsentsligand suure valgumolekuli (molekulmass üle 40 kDa) aktiivtsentrisse ning selle tulemusel polarisatsioon suureneb ning mõõtmistulemustest saab välja arvutada kas ligandi dissotsiatsioonikonstandi ( $K_D$ ) või aktiivse ensüümi kontsentratsiooni lahuses. Teisel juhul toimub fluorestsentsligandi väljatõrjumine selle kompleksist PK-ga ATP-konkurentse, valksubstraadi-konkurentse või bisubstraatses mitte-fluorestseeruva inhibiitori poolt, mis põhjustab polarisatsiooni vähenemise. Tulemustest saab välja arvutada PK mitte-fluorestseeruva inhibiitori väljatõrjumiskonstandi ( $K_d$ ) väärtuse [80].

FA meetodi eelisteks on lihtsus, kiirus, homogeensus ja võimalik automatiseeritavus, mistõttu saab seda kasutada uute inhibiitorite sõeluuringutes. Peamiseks piiranguks on liiga madala afiinsusega PK-de fluorestsentssondid ( $K_D > 10$  nM), mille tõttu tuleb kasutada kõrget kinaasi kontsentratsiooni ja see muudab analüüsi kalliks. Suure afiinsusega ligandide ( $K_D < 10$  nM) korral saab kasutada nanomolaarset ensüümi kontsentratsiooni.

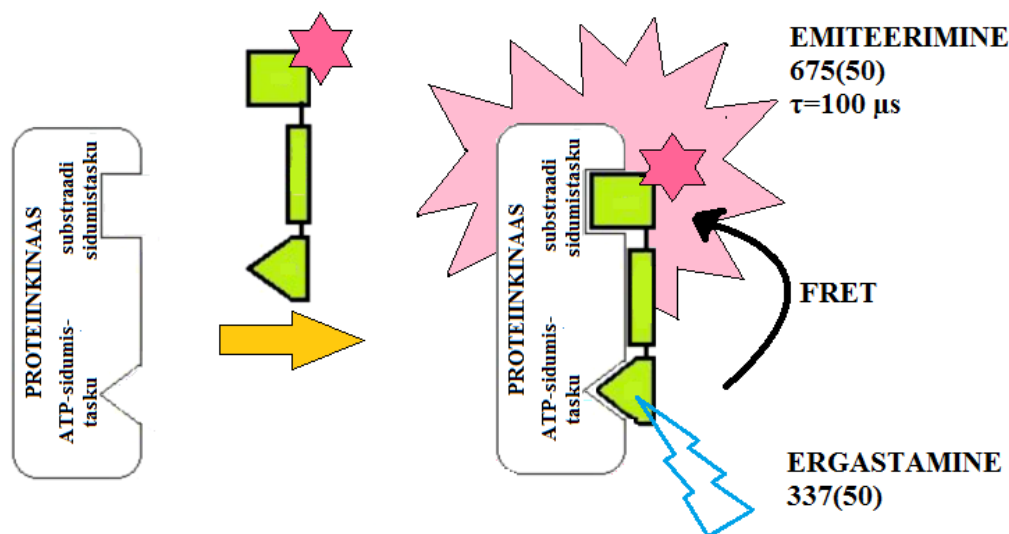
#### 3.1.4.2 ARC-Lum sondide fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev sidumis-/väljatõrjumismeetod (LUM)

Aeg-lahutatud luminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhineval sidumis-/väljatõrjumismeetodis kasutatakse pika elueaga fotoluminestsentssonde [ARC-Lum(Fluo) sondid]. Meetod lubab määrata sondi dissotsiatsioonikonstanti kompleksist konkreetse PK-ga, aktiivse PK kontsentratsiooni ja/või mitte-luminestseeruvate inhibiitorite afiinsust.

ARC-Lum(Fluo) fotoluminestsentssondide tööpõhimõtte füüsikaline taust pole hetkeksisuga täielikult selge, kuid ilmselt kasutab see fosforestsentsi või selle sarnast nähtust. Fosforestsents on fotoluminestsentsi vorm, milles ergastatud ühend emiteerib valgust, minnes tripletsest olekust tagasi singletsesse põhiolekusse. See toimub aeglaselt ( $\mu$ s kuni ms jooksul) võrreldes fluorestsentsiga (fluorestsentsi eluiga 0.1-10 ns). Seetõttu omavad fotoluminestsentssondid pikka, mikro- kuni millisekunditesse jäävat eluiga. See annab eelise ARC-Lum sondide kasutamisel keerulisemates bioloogilistes süsteemides, kuna sel juhul ei sisalda mõõdetav signaal nanosekundite jooksul „hääbuvat“ orgaaniliste ühendite fluorestsentsi ja rakkude autofluorestsentsi.

ARC-Lum(Fluo) fotoluminestsentssondid on ARC-tüüpi inhibiitorid, mille koostisesse kuuluvad tiofeeni või selenofeeni sisaldavad heteroaromaatsed tsüklid ning mis on märgistatud fluorestsentsvärviga. PK-ga seotud ARC-Lum(Fluo) sondi ergastamine valgusimpulsiga lähis-UV alas ( $\lambda < 380$  nm) tekitab pika elueaga luminestsentsi (19-266  $\mu$ s) ARC-Lum(Fluo) fluorofoori emissionspektrile vastavas alas (Joonis 14). See optiline

fenomen põhineb Försteri tüüpi kiirgusvabal resonantsenergia ülekandel (FRET, *Förster type radiationless resonance energy transfer*) tripletses olekus olevalt ATP-taskusse seotud doonorilt singletses olekus aktseptorile. ARC-Lum(Fluo) sondide korral on doonoriks tiofeeni või selenofeeni tsükli sisaldav aromaatsete rühmade kogum, mis seondub kinaasi ATP-saiti, ning aktseptoriks fluorestsentsvärv. Försteri-tüüpi energiaülekanne eeldab, et fluorestsentsvärv asub luminesentsi doonori lähedal ning akseptori ergastusspekter kattub doonori emissioonispektriga. Vabalt lahuses olevad ARC-Lum(Fluo) sondid ei emiteeri pika elueaga valgust, samas kui nende seostumine kinaasile põhjustab intensiivse luminesents-signaali tekke aeg-lahutatud-aknas mõõtmisel (st enne mõõtmist teatud viivitusaeg).



**Joonis 14.** Valk-indutseeritud pika elueaga foto-luminesents. Vaba ARC-Lum sond annab tühise signaali, võrreldes seostunud sondiga. Heleroheliselt on joonisel kujutatud ARC-Lum sond, tumeroosa kujutab peptiidi külge seotud fluorestsentsvärvi, heleroosa kujutab ARC-Lum sondi seostumisel PK-le FRET-i tulemusel tekkinud fluorestsentsvärvi emissiooni.

ARC-Lum(Fluo) sondide eelisteks on nende kõrge afiinsus, pikk luminesentsi eluiga ja suur eredus; neil põhinevad sidumismeetodid on kiired, lihtsad ning ei vaja lisasubstraate või teisi reagente (nt antikehad). Lisaks on analüüsiks vajalik kinaasi hulk väga väike. Sarnaselt FA meetodiga, on LUM-meetodil kaks alaliiki: sidumis- ning väljatõrjumismeetod. LUM sidumismeetodiga saab määrata nii ARC-Lum(Fluo) sondi dissotsiatsioonikonstanti kompleksist kinaasiga kui ka kinaasi aktiivset kontsentratsiooni (nii nagu kõik ARC-tüüpi inhibiitorid, seostuvad ARC-Lum sondid suurema afiinsusega just katalüütiliselt aktiivsele PK-le). LUM väljatõrjumismeetodis lubab mitteseostunud sondi emissiooni tühine intensiivsus kasutada kõrget sondi kontsentratsiooni. See võimaldab iseloomustada kõrge afiinsusega väljatõrjuvaid ühendeid, nihutades nende väljatõrjumiskõverat eemale piirkonnast, kus nende  $IC_{50}$  väärtus on väiksem kui aktiivse ensüümi kontsentratsioon. LUM meetod on ka automatiseeritav, mis võimaldab seda kasutada kiirsõelumisanalüüsis [81].

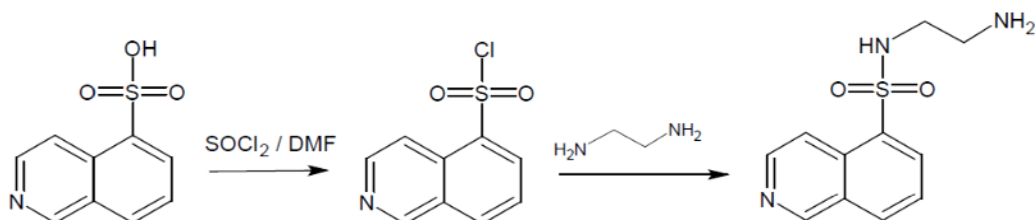
Antud töös kasutatakse tiofeeni ja fluorestsentsvärvi Alexa-647 sisaldavat ARC-Lum(Fluo) sondi **ARC-1063**.

## 4. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 4.1. Süntees

#### 4.1.1 H9 süntees

H9 fragmendi süntees teostati vastavalt allikas [54] toodud protseduurile. Ühendi sünteesiskeem on kujutatud alloleval joonisel (Joonis 15).

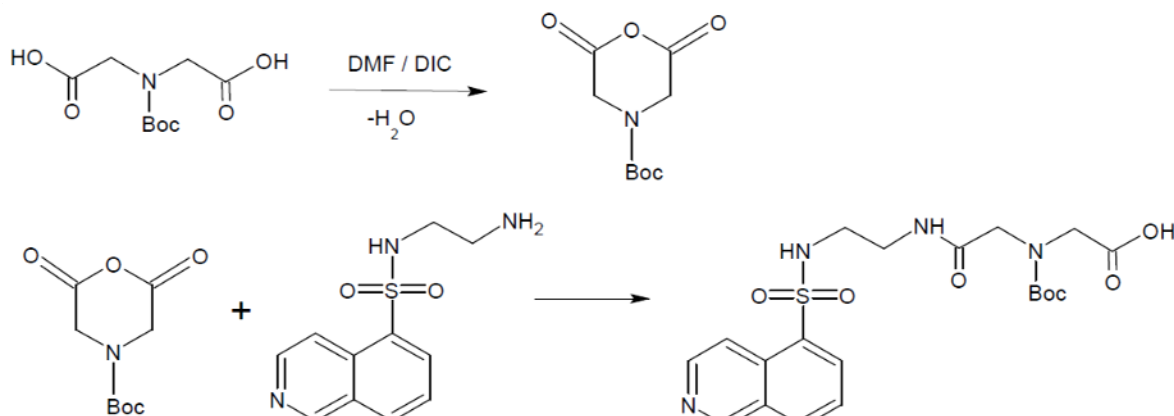


Joonis 15. H9 sünteesiskeem.

Kolbi kaaluti 502 mg (0.240 mmol, 2 ekv) IQS, lisati 2.3 ml  $\text{SOCl}_2$  (19 ekv) ja 20  $\mu\text{l}$  DMF (katalüütiline kogus, 10%). Kolvi peale asetati püstjahuti ja kuumutati segu  $80^\circ\text{C}$  juures 2...2.5 h jooksul õhkvannil. Seejärel roteeriti lahus kokku, suspendeeriti saadud pulber 2 ml-s DCE-s, filtreeriti ja pesti filtril DCE-ga (3 korda 2 ml DCE-ga). Väljafiltreeritud vaheprodukt lahustati 4 ml DCE ja 1 ml DIEA segus. Eraldi kolbi jääl pipeteeriti 2 ml diaminoetaani ning lisati sellele tilkhaaval vaheprodukti lahust. Jäävann eemaldati ja lasti reaktsioonil toimuda 15 min toatemperatuuril. Tehti TLC (õhukese kihi kromatograafia), voolutiks kloroform/metanool/DIEA (800/600/70, v/v/v), et kontrollida reaktsiooni lõpunimineku (H9  $R_f = 0.44$ ). Reaktsioonisegu roteeriti kokku. Saadud õlijas produkt ekstraheeriti ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , pH = 10 *versus*  $\text{CHCl}_3$ ) ja koguti orgaaniline faas (st kloroform koos produktiga). Lahus kuivatati veevaba  $\text{MgSO}_4$ -ga ja roteeriti taas kokku. Pärast kuivatamist oli produkti mass 108 mg (saagis 20%).

#### 4.1.2 H9 ja N-Boc-2,2'-iminodietaanhapest koosneva fragmendi süntees

H9 ja N-2,2'-iminodietaanhapest koosneva fragmendi sünteesiskeem on toodud alloleval joonisel (Joonis 16).



Joonis 16. H9 ja N-Boc-2,2'-iminodietaanhapest koosneva fragmendi sünteesiskeem.

Kaaluti 66.8 mg (1 ekv) N-Boc-2,2'-iminodietaanhapet ja lahustati 300 µl DMF-s (100 µl kaupa). Lisati 49.4 µl DIC (1.1 ekv) ja lasti reaktsioonil toimuda 15 min toatemperatuuril. Kuna vaheprodukt ei tohi kokku puutuda veega, asetati peale vett imava ainega (CaCl<sub>2</sub>) toru. Reaktsiooni käigus tekkis polaarne DMF-s mittelahustuv sade. Reaktsioonisegu lahustuv fraktsioon lisati paari tilga kaupa pidevalt segades esimeses etapis valmistatud H9-le. Et tekkinud sademe vahelt ainet kätte saada, pesti eelmises etapis tekkinud sade veel 100 µl DMF-ga ning lisati samuti H9-le. Reaktsioonil lasti toimuda 1 h toatemperatuuril. Seejärel roteeriti segu 25 min jooksul kokku, kuivatati üleöö lüofilisaatoris ning puhastati HPLC-ga. Puhastatud produkti molekulmass tõestati MALDI-TOF abil (eksperimentaalne [M+Na<sup>+</sup>] 489.51 g/mol, teoreetiline [M+Na<sup>+</sup>] 489.51 g/mol). H9 ja N-Boc-2,2'-iminodietaanhappe fragmendil on kõrvalreaktsioonide vältimiseks sekundaarne aminorühm kaitstud Boc-kaitserühmaga. Kaitserühm eemaldatakse SPPS käigus viimases etapis (sh on eelnevalt viidud läbi fragmendi ühendamine peptiidse osaga) koos produkti mahavõtmisega vaigult.

#### 4.1.3 ARC-ühendite süntees

Peptiidfragmentide süntees viidi läbi traditsioonilise Fmoc-SPPS meetodika kohaselt [91], kasutades põhisolvendina DMF, mida võeti 1 ml 100 g vaigu kohta (aktiivrühmade kontsentratsioon 0.45 mmol/g). Enne atsüülimist lasti vaigul põhilahustis 45 min punduda.

Fmoc-kaitserühm võeti N-terminaalilt maha 20%-lise piperidiini lahusega (5+15 min). *D*- või *L*-aminohape (3 ekv vaigu aktiivrühmade suhtes) aktiveeriti HOBt (2.9 ekv), HBTU (2.9 ekv) ja NMM (9 ekv) seguga, mis pipeteeriti reaktsiooninõusse. Atsüülimisreaktsioon viidi läbi 90 min jooksul. Igale atsüülimise ja kaitserühma mahavõtmise reaktsioonile järgnes viiekordne pesemisprotseduur DMF-ga. Kõigi atsüülimisreaktsioonide täielikkust kontrolliti Kaiseri testi abil, vajadusel korraldati atsüülimist.

H9 ja N-Boc-2,2'-iminodietaanhapest koosnev fragment (3 ekv) ühendati vaiguga seotud konjugaadi külge (1 ekv), kasutades aktiveerimisseguga HBTU (2.9 ekv), HOBt (2.9 ekv) ja NMM (10 ekv). Reaktsioon viidi läbi üleöö (keskmise saagis 35%).

Standardsele produkti vaigult mahavõtmise protseduurile eelnes pesemine kolme solvendiga - DMF (5 korda), propaan-2-ool (5 korda) ja DCE (5 korda) - ning produktiga vaigu kuivatamine vaakumis (1h). Produkti mahavõtmiseks vaigult kasutati TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (90/5/5 v/v/v) segu (3h). Seejärel koguti lahus vaigu kohalt eraldi kolbi ja roteeriti vaakumis kokku. TFA jääkide eemaldamiseks pesti veega (3 korda) ning TIPS eemaldamiseks tritueerimine metüül-*tert*-butüüleetriga (2 korda). Järgnes puhastamine HPLC-ga. Kõik reaktsioonid viidi läbi toatemperatuuril. Produktide molekulmassid määrati MALDI-TOF abil ning kontsentratsioonid mõõdeti spektrofotomeetriga.

## 4.2 Biokeemilised mõõtmised

### 4.2.1 FA-meetod

Sidumis- ja väljatõrjumiskõverad mõõdeti vastavalt eelnevalt kirjeldatud meetodile [80]. Kasutatud FA puhver sisaldas järgnevaid komponente: 50 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT ja 7.5  $\mu$ M (0.5 mg/ml) BSA. Ensüümi aktiivne kontsentratsioon määrati eelnevalt, kasutades fluorestsentsi anisotroopia sidumismeetodit, tiitrides ensüümi kahe erineva kontsentratsiooniga fluorestsentssondiga. Selleks valmistati tumedal mittesiduva pinnaga 384-süvendilisel mikroplaadil kolmekordsed ensüümi lahjendusread FA puhverlahuses. Seejärel lisati mõlemale seeriale fluorestsentssondi (**ARC-583**, lõppkontsentratsioon esimeses seerias 2 nM ja teises 20 nM), saades lõppruumalaks 20  $\mu$ l. Mikroplaati inkubeeriti 30°C juures 15 min ja seejärel mõõdeti fluorestsentsi anisotroopia väärtused PHERAstar mikroplaadi lugejaga. Sidumiskõverad lähendati anisotroopia tiitrimise võrranditele, kasutades tarkvara GraphPad Prism versiooni 5.0 [80].

Väljatõrjumismeetodi korral valmistati 384-süvendilisel mikroplaadil kolmekordsed inhibiitori lahjendusseeriad. Igasse süvendisse viidi võrdne kogus fluorestseeruvast ligandist ja ensüümist koosnevat kompleksi lahust FA puhvris (PKAc korral kasutati ensüümi kontsentratsiooni 2 nM ja fluorestsentsmärgistatud sondi **ARC-583** kontsentratsiooni 3 nM ( $K_D = 0.48$  nM); ROCK-II korral kasutati kinaasi kontsentratsiooni 2 nM ja fluorestsentsmärgistatud sondi **ARC-1042** kontsentratsiooni 3 nM ( $K_D = 0.10$  nM)). Mikroplaati inkubeeriti 30°C juures 15 min ja seejärel mõõdeti fluorestsentsi anisotroopia väärtused PHERAstar mikroplaadi lugejaga. Väljatõrjumiskõverad lähendati sigmoidsele doos-vastavale mudelile, kasutades tarkvara GraphPad Prism versiooni 5.0, et määrata inhibiitorite  $IC_{50}$  väärtuseid ( $IC_{50}$  vastab inhibiitori kontsentratsioonile, mille juures on fluorestseeruva ligandi ja kinaasi kompleksi hulk vähenenud pooleni maksimaalsest võimalikust) [80].

### 4.2.2 LUM-meetod

Sidumis- ja väljatõrjumiskõverad mõõdeti vastavalt kirjeldatud meetodile [80]. Aktiivse ensüümi kontsentratsioon määrati sarnaselt eelnevalt kirjeldatud FA sidumismeetodiga (luminesentssondina kasutati **ARC-1063**, lõppkontsentratsioon esimeses seerias 2 nM ja teises 20 nM). Väljatõrjumismeetodi korral kasutati PKAc puhul ensüümi kontsentratsiooni 2 nM ja ROCK-II korral 1.5 nM; ARC-Lum sondi **ARC-1063** kontsentratsiooni oli 30 või 100 nM (PKAc suhtes  $K_D = 0.010$  nM; ROCK-II suhtes  $K_D = 0.20$  nM). Komponendid segati kokku 384-süvendilisel mikroplaadil, inkubeeriti 1h (PKAc korral) või 15 min (ROCK-II korral) 30°C juures (inkubatsiooniajad eelnevalt optimeeritud) ning seejärel mõõdeti

luminestsentsi intensiivsuse väärtused PHERAstar mikroplaadi lugejaga. Luminestsentssond **ARC-1063** ergastati 337 nm juures lühikeste valgusimpulssidega (200 valgusimpulssi mikroplaadi süvendi kohta), kasutades 50 µs viivitusaega enne mõõtmist, millele järgnes konstantne 150 µs fluorestsentssignaali kogumise aeg lainepikkusel 675(50) nm [81]. Sidumiskõverad lähendati anisotroopia tiitrimise võrranditele, kasutades tarkvara GraphPad Prism versiooni 5.0 (Joonis 18).

Inhibiitorite dissotsiatsioonikonstantide ( $K_d$ ) väärtused arvutati kasutades Cheng-Prusoffi võrrandit, kus konkurentse ligandi rollis oli **ARC-1063**.

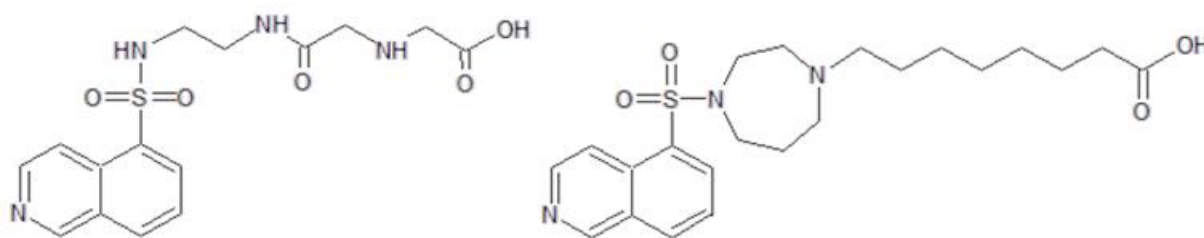
$$\text{Cheng-Prusoff võrrand: } K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c(\text{ARC-1063})}{K_D(\text{ARC-1063})}}$$

## 5. TULEMUSTE ANALÜÜS

### 5.1. Tulemuste üldine kirjeldus

Käesoleva töö eesmärgiks oli kõrge afiinsusega H9-sisaldavate ARC-tüüpi bisubstraatseid inhibiitorite saamine. H9-sisaldavaid ARC-inhibiitoreid on sünteesitud ka varem, kuid nende afiinsus jäi väiksemaks, kui teoreetiliselt optimaalse linkeriga võimalik saavutada<sup>3</sup>. Üheks taoliseks ühendiks on **ARC-903**, mille IC<sub>50</sub> väärtus on 5.3 nM [77].

Antud töö esimeses osas sünteesiti ARC-tüüpi inhibiitoreid, mis sisaldasid ATP-d jäljendava fragmendina H9 ja N-2,2'-iminodietaanhappest koosnevat fragmenti (ühendid **I - X**). H9 ja N-2,2'-iminodietaanhappest koosnev fragment (Joonis 17) sünteesiti eesmärgiga lisada struktuuri sekundaarne aminorühm, mis saab anda vesiniksideme PK-ga. Inhibiitoritel varieeriti peptiidse osa arginiinijääkide arvu (2 või 6 *D*-Arg) ning linkerite struktuuri.



**Joonis 17.** Vasakul on toodud H9 ja N-2,2'-iminodietaanhappest koosneva fragmendi ja paremal Fasudili ja *n*-oktaanhappest koosneva fragmendi struktuur.

Töö teises osas iseloomustati sünteesitud ainete afiinsust PK-de suhtes, kasutades eelnevalt arendatud FA- ja LUM-meetodeid [80,81]. Kõikide IQS-i sisaldavate inhibiitorite afiinsust mõõdeti PKAc ja ROCK-II suhtes. PKAc-d kasutatakse Dr Asko Uri uurimisrühmas nõ standardkinaasina erinevate PK-de ja nende inhibiitorite iseloomustamisel. ROCK on huvipakkuv kinaas oma farmakoloogilise tähtsuse poolest.

Biokeemiliste mõõtmiste käigus kirjeldati lisaks bisubstraatseid inhibiitoreid, mis sisaldasid ATP-d jäljendava struktuuriüksusena Fasudil-oktaanhappe fragmenti (Joonis 17) (ühendid **ARC-3000** ja **ARC-3002**). Antud ühendid sünteesiti Madis Hurt'i ja Dr Darja Lavõgina poolt, eesmärgiks saada ROCK-i selektiivsed ühendid, kuna Fasudil peaks suurendama inhibiitorite ROCK-suunalist selektiivsust.

### 5.2. Inhibiitorite süntees

Käesolevas töös kasutati ARC-de sünteesil uut sünteesistrateegiat. Nimelt sünteesiti varasemalt publitseeritud ühendite (nt **ARC-903**, vt Joonis 9) puhul lahuses valmis ainult nukleosiidne osa (H9) ning ühendati see tahkel faasil ülejäänud konjugaadiga. Viimane

<sup>3</sup> Bisubstraatse inhibiitori kahe fragmendi omavahelisel ühendamisel sobiva linkeriga on võimalik saada kuni 3 suurusjärku suurema afiinsusega ühend kui kummalgi fragmendil omaette. Nt H9 IC<sub>50</sub> väärtus on 3.7 µM; selle ühendamisel peptiidse osaga (ca 1 mM afiinsus) läbi sobiva linkerite on teoreetiliselt võimalik saada konjugaat, mille afiinsus jääb pikomolaarsesse alasse.

reaktsioon on nukleofiilne asendusreaktsioon ( $S_N2$ ), mille kiirus on tundlik steeriliste takistuste suhtes. Seega, mida suurem on steeriline takistus reaktsioonitsentris, seda halvemini saab nukleofiil atakeerida elektrofiilset tsentrit ning reaktsioon toimub aeglasemalt ja väiksema saagisega. Seevastu antud töös sünteesiti lahuses valmis H9 ja N-Boc-2,2'-iminodietaanhapest koosnev fragment (st sisuliselt nukleosiidse osa ja linkeri või linkeri osa konjugaat) ning see suurem molekul ühendati tahkel faasil ülejäänud konjugaadiga. Viimatimainitud juhul on tegemist atsüülimisreaktsiooniga, mille efektiivsuse tõstmiseks sai rakendada tavalisi SPPS-is kasutusel olevaid aktivaatoreid. Seega lubas kirjeldatud sünteesiskeem lühendada viimase etapi reaktsiooniga 15 tunnilt 3 tunnini ja tõsta sünteesi üldist saagist 10%-lt 30...40%-ni. Lõpptulemuseks saadi kaitserühmadeta 2,2'-iminodietaanhappe jääki (Ida) sisaldav ühend, H9-Ida fragmenti sisaldav bisubstraatne inhibiitor, milles Ida toimis linkerina või linkeri osana. Selline linker sisaldas sekundaarset aminorühma, mis võib käituda vesiniksideme doonorina.

Sünteesitavate bisubstraatsete inhibiitorite peptiidseks osaks valiti algselt kahest *D*-arginiiniijäägist koosnev peptiid. Hiljem suurendati afiinsemate ühendite peptiidse osa pikkus kuue *D*-arginiiniijäägini. Lühendatud peptiidne fragment valiti eesmärgiga hoida inhibiitorite afiinsust mõõdukates piirides, et biokeemiliste mõõtmiste tulemused oleksid usaldusväärsemad. Eelnevalt on näidatud, et peptiidse osa arginiiniijääkide arvu kasvuga suureneb reeglina ka inhibiitori afiinsus [77,78].

### 5.3. Sünteesitud inhibiitorite biokeemiline iseloomustamine

H9-Ida fragmenti ja kahte *D*-Arg peptiidse osas sisaldavate ühendite **I** - **VII**  $K_d$  väärtused nii PKAc kui ROCK-II suhtes jäid väiksemaks kui võrdlusaine **ARC-1012** korral, mis sisaldas samuti kahte *D*-Arg, kuid ATP-d jäljendava fragmendina adenosiin-4'-dehüdrosümetüül-4'-karboksüülhappe jääki (Adc) (väärtused toodud Tabelis 3). Nagu eeldatud, tõusis peptiidse osa *D*-arginiiniijääkide arvu suurendamisega 2-lt 6-le (ühendid **VIII** - **X**) ühendite afiinsus. PKAc suhtes tõusis afiinsus 30...40 korda, kuid jäi siiski väiksemaks kui võrdlusaine **ARC-903** korral (sisaldas ATP-d jäljendava fragmendina H9-t). ROCK-II puhul suurendas *D*-Arg arvu tõstmine inhibiitorite afiinsust veelgi enam: ühendite **VIII** - **X**  $K_d$  väärtused oli võrreldes nende kahe *D*-arginiiniijäägiga analoogidega (vastavalt ühendid **I**, **III** ja **VII**) umbes 100 korda väiksemad (mõõtmistulemused toodud Tabelis 3).



**Tabel 3.** Mõõtmistulemused.

| Kood/<br>ühendi nr | Struktuur   | log IC <sub>50</sub><br>(PKAc) <sup>a</sup> | K <sub>d</sub> (PKAc),<br>nM <sup>c</sup> | log IC <sub>50</sub><br>(ROCK-II) <sup>b</sup> | K <sub>d</sub> (ROCK-II), nM <sup>c</sup> |
|--------------------|---|---|---|--|---|
| <b>ARC-1012</b>    | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                      | -7.22 [0.04]                                | 8.9                                       | -6.79 [0.04]                                   | 7.0                                       |
| <b>ARC-903</b>     | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C(=O)-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> | -8.26 [0.04]                                | 0.53                                      | -8.61 [0.07]                                   | alla 0.5                                  |
| <b>I</b>           | H9-Ida-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                       | -4.78 [0.20]                                | 2500                                      | üle -4.5                                       | ma  |
| <b>II</b>          | H9-Ida-Gly-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | -4.72 [0.16]                                | 2900                                      | üle -4.5                                       | ma  |
| <b>III</b>         | H9-Ida-Apr-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | -5.26 [0.07]                                | 820                                       | üle -4.5                                       | ma  |
| <b>IV</b>          | H9-Ida-Abu-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | -4.63 [0.20]                                | 3500                                      | üle -4.5                                       | ma  |
| <b>V</b>           | H9-Ida-Pamb-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                  | -4.77 [0.06]                                | 2600                                      | -4.57 [0.15]                                   | 1200                                      |
| <b>VI</b>          | H9-Ida-(L-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                       | üle -4.5                                    | ma  | -4.79 [0.12]                                   | 690                                       |
| <b>VII</b>         | H9-Ida-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                                   | -4.57 [0.20]                                | 4100                                      | üle -4.5                                       | ma  |
| <b>VIII</b>        | H9-Ida-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                       | -6.07 [0.06]                                | 130                                       | -7.46 [0.04]                                   | 1.5                                       |
| <b>IX</b>          | H9-Ida-Apr-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                   | -6.79 [0.03]                                | 24  | -7.75 [0.05]                                   | ~0.70                                     |
| <b>X</b>           | H9-Ida-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                                   | -6.10 [0.05]                                | 120                                       | -6.82 [0.05]                                   | 6.4                                       |

<sup>a</sup> FA-meetodiga mõõdetud IC<sub>50</sub> logaritmilised väärtused fluorestsentssondi **ARC-583** (2 nM) väljatõrjumisel kompleksist PKAc-ga (3 nM). <sup>b</sup> FA-meetodiga mõõdetud IC<sub>50</sub> logaritmilised väärtused fluorestsentssondi **ARC-1042** (2 nM) väljatõrjumisel kompleksist ROCK-II-ga (3 nM). <sup>c</sup>Online kalkulaatoriga arvutatud väljatõrjumiskonstandi K<sub>d</sub> väärtused [92]. *ma*, mitte arvutatud. Ühendite numbritele vastavate ARC-tüüpi inhibiitorite koodid ja struktuurid on toodud Lisa 1-s.

Ühendite afiinsuse suurendamiseks sihtmärk-kinaaside suhtes on ARC-tüüpi inhibiitorite struktuuri varasemalt lisatud linkereid eraldav kiraalne element (nt *L*-Lys või *D*-Lys) [78]. Ühendites **I** - **V** ja **VIII** - **IX** kasutati kahe linkeri vahele jääva kiraalse elemendina *D*-Lys ja ühendis **VI** *L*-Lys. Ida jäägile järgneva *D*-Lys asendamine *L*-Lys-ga (vastavalt ühendid **I** ja **VI**) vähendas tugevalt afiinsust PKAc-le (*log* IC<sub>50</sub> väärtused vastavalt -4.72 ja üle -4.5), kuid ROCK-II puhul vastupidiselt suurendas see asendus afiinsust (*log* IC<sub>50</sub> väärtused vastavalt üle -4.5 ja -4.79) (Tabel 3). Eelnev uurimus on näidanud, et nukleosiidse osana Adc-sisaldavate ühendite korral linkereid eraldava *D*-aminohappelise kiraalse elemendi vahetamine *L*-isomeeriga alandas märkimisväärselt ühendite afiinsust PKAc suhtes [78]. Käesolev töö kinnitas varasemalt märgatud tendentsi ning seetõttu võib väita, et *L*-aminohappeline kiraalne element linkerite vahel suurendab inhibiitorite selektiivsust ROCK-II-le, võrreldes PKAc-ga.

Kõige suurema inhibeerimispotentsiaaliga IQS-i sisaldaval ühendil (ühend **IX**) oli subnanomolaarne K<sub>d</sub> väärtus ROCK-II suhtes (K<sub>d</sub> ~ 0.70 nM), mis on võrreldav referentsainega **ARC-903** (K<sub>d</sub> < 0.5 nM). Võrdlusaine **ARC-903** omab sarnast afiinsust nii PKAc-le kui ka ROCK-II-le (K<sub>d</sub> väärtused vastavalt 0.53 nM ja <0.5 nM), kuid ühendi **IX** korral on afiinsuste erinevus kahe kinaasi vahel märgatav: K<sub>d</sub> väärtus PKAc ja ROCK-II

korral vastavalt 24 nM ja ~0.70 nM ehk erinevus on ligi 35-kordne). Veelgi parem oli ühendi **VIII** selektiivsus ROCK-II-le võrreldes PKAc-ga: ühendi **VIII** afiinsus ROCK-II le oli ligi 90 korda parem kui PKAc-le ( $K_d$  väärtused vastavalt 1.5 nM ja 130 nM). Eelnevalt on avaldatud, et **ARC-903** on laia inhibeerimisprofiiliga ning on inhibiitor mitmetele PK-dele [77]. Seetõttu on ühendid **VIII** ja **IX** huvipakkuvad rakenduste jaoks, mis nõuavad selektiivsust ROCK-i suhtes, samas kui **ARC-903** on hea universaalsond erinevate kinaaside jaoks.

#### 5.4. LUM mõõtmismeetodi modifitseerimine kõrge afiinsusega ühendite iseloomustamiseks

Paralleelselt antud töö raames sünteesitud H9-Ida fragmenti sisaldavate ARC-inhibiitorite biokeemilise iseloomustamisega jätkati tööd varasemalt Dr Asko Uri laboris sünteesitud ühenditega, Fasudil-oktaanhappe konjugaatidega. Kuna ATP-sidumistaskusse seostuv isokinoliini derivaat 1-(5-isokinoliinsulfonüül)-homopiperasiin (Fasudil ehk HA1077) on selektiivne ROCK-i inhibiitor, oli mõõtmiste eesmärgiks välja selgitada, kas Fasudil säilitab oma selektiivsed omadused, kui lisada talle peptiidne osa.

Fasudil-oktaanhappe fragment oli inhibiitorites linkeri kaudu ühendatud kahest (**ARC-3000**) või kuuest (**ARC-3002**) *D*-arginiinijäägist koosneva peptiidse fragmendiga. Linkeriteks olid Fasudil-oktaanhappe fragmendis sisalduv oktaanhappe jääk ja peptiidse osa poolne aminoheksaanhappe jääk, mida eraldas kiraalne element *D*-Lys. Esialgsed mõõtmised Dr Uri laboris FA-meetodiga näitasid, et **ARC-3002** ja mitme referentsaine afiinsused jäid subnanomolaarsesse piirkonda (st kasutatava ensüümi kontsentratsiooni lähedale), mis ei luba  $K_d$  usaldusväärselt arvutada (nn tiheda-sidumise-ala) ning teha lõplike järeldusi **ARC-3002** selektiivsuse kohta ROCK-i suhtes. Seetõttu kasutati antud töös LUM-meetodi varianti, kus võetakse luminescentssondi palju kõrgemas kontsentratsioonis kui ensüümi (sel juhul on luminescentssignaali endiselt proportsionaalne kinaasiga seotud luminescentssondi kontsentratsiooniga, aga mitteseostunud sondi signaal on võrreldes kinaasile seostunuga tühine ning seega ei mõjuta detekteeritavat signaali). Lisaks, ARC-Lum(Fluo) sond ja mitte-luminesceeruv inhibiitor konkureerivad sidumiskoha pärast ensüümil ning mida suurem on ARC-Lum(Fluo) kontsentratsioon, seda suurema tõenäosusega on tasakaalu saabudes just luminescentssond ensüümiga seotud. Luminescentssondina kasutati **ARC-1063**, mis omab suurt afiinsust nii PKAc kui ROCK-II suhtes (sondi dissotsiatsioonikonstandid vastavalt  $K_D = 0.010$  nM ja  $K_D = 0.20$  nM) [81].

Biokeemilistes mõõtmistes määrati LUM-meetodi abil kuue ARC-tüüpi ühendi afiinsus PKAc ja ROCK-II suhtes (mõõtmistulemused toodud Tabelis 4). Võrdlusühenditena kasutati H89 (PKA-selektiivne inhibiitor) ja Fasudili.

**Tabel 4.** Mõõtmistulemused.

| Kood/<br>ühendi<br>nr | Struktuur  | log IC <sub>50</sub><br>(PKAc) <sup>a</sup> | K <sub>d</sub><br>(PKAc),<br>nM <sup>c</sup> | log IC <sub>50</sub><br>(ROCK-II) <sup>b</sup> | K <sub>d</sub><br>(ROCK-<br>II), nM <sup>c</sup> | Selektiivsus-<br>indeks <sup>d</sup> |
|-----------------------|--|---|--|--|--|--------------------------------------|
| <b>ARC-664</b>        | AMTH- Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> | -6.78<br>[0.06]                             | 0.056  | -8.56*<br>[0.03]                               | 0.0056*  | <b>10</b>                            |
| <b>ARC-902</b>        | Adc-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>               | -6.12<br>[0.04]                             | 0.25   | -6.60<br>[0.06]                                | 1.5  | <b>0.17</b>                          |
| <b>ARC-1012</b>       | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>   | -4.87<br>[0.03]                             | 4.5  | -6.01<br>[0.02]                                | 6.4  | <b>0.7</b>                           |
| <b>ARC-1028</b>       | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>   | -6.12<br>[0.03]                             | 0.26   | -7.98*<br>[0.05]                               | 0.021*   | <b>12</b>                            |
| <b>ARC-3000</b>       | Fas- Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>  | -4.12<br>[0.05]                             | 25   | -5.17<br>[0.04]                                | 45   | <b>0.56</b>                          |
| <b>ARC-3002</b>       | Fas- Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>  | -5.01<br>[0.02]                             | 3.3  | -7.99*<br>[0.04]                               | 0.020*   | <b>165</b>                           |
| <b>H89</b>            |  | -4.30<br>[0.04]                             | 17   | -5.44<br>[0.03]                                | 24   | <b>0.7</b>                           |
| <b>Fasudil</b>        |  | -4.26 <sup>#</sup><br>[0.08]                | 420 <sup>#</sup>                             | -4.93<br>[0.10]                                | 78   | <b>5.4</b>                           |

<sup>a</sup> LUM-meetodiga mõõdetud IC<sub>50</sub> logaritmilised väärtused luminestsentssondi **ARC-1063** (30 nM või 2 nM<sup>#</sup>) väljatõrjumisel kompleksist PKAc-ga (2 nM). <sup>b</sup> LUM-meetodiga mõõdetud IC<sub>50</sub> logaritmilised väärtused luminestsentssondi **ARC-1063** (30 nM või 100 nM\*) väljatõrjumisel kompleksist ROCK-II-ga (1,5 nM). <sup>c</sup> Cheng-Prusoff võrrandi abil arvutatud K<sub>d</sub> väärtused. <sup>d</sup> Indeks, mis on defineeritud kui inhibiitori afiinsuste (K<sub>d</sub> väärtuste) suhe katsetes PKAc ja ROCK-II kinaasidega. Ühendite koodidele vastavate ARC-tüüpi inhibiitorite struktuurid on toodud Lisa 1-s; H89 ja Fasudili struktuurid toodud Tabel 2-s.

LUM-meetodiga teostatud väljatõrjumiseksperimendid, kus kasutati kõrget luminestsentssond **ARC-1063** kontsentratsiooni (30 või 100 nM), näitasid, et **ARC-3002** omab pikomolaarset afiinsust ja selektiivsust ROCK-II suhtes, võrreldes PKAc-ga (K<sub>d</sub> väärtused vastavalt 0.020 nM ja 2.3 nM ehk afiinsuste erinevus on 160-kordne). Sellest võib järeldada, et Fasudili fragment tõepoolest kindlustas bisubstraatsete inhibiitorite selektiivsuse ROCK-i suhtes.

Lisaks oli saadud Fasudili fragmenti sisaldava ARC-tüüpi ühendi afiinsus (**ARC-3002**) enam kui kolm suurusjärku suurem võrreldes Fasudili endaga. **ARC-3002** on seega tänu oma pikomolaarsele K<sub>d</sub> väärtusele (K<sub>d</sub> = 20 pM) ja suurele ROCK-II selektiivsusele võrreldes PKAc-ga silmapaistev ROCK-II inhibiitor.

Kokkuvõtteks on antud töö kõige olulisemateks tulemusteks:

- IQS-i sisaldava ühendi **VIII** märkimisväärne selektiivsus ROCK-II-le, võrreldes PKAc-ga (afiinsuste erinevus 90 korda);
- ühendi **IX** subnanomolaarne K<sub>d</sub> väärtus ROCK-II suhtes (K<sub>d</sub> ~ 0.70 nM) ning samuti arvestatav selektiivsus ROCK-i suhtes (afiinsuste erinevus 35-kordne);

- LUM-meetodi modifitseeritud varianti kasutades mõõdetud ühendi **ARC-3002** pikomolaarne afiinsus ( $K_d = 20$  pM) ning suur selektiivsus ROCK-II-le (afiinsuste erinevus 165-kordne).

Lisaks kinnitati varem kirjeldatud tendentsi, et ROCK-II selektiivsuse suurendamiseks PKAc suhtes on võimalik kasutada *L*-aminohappelist kiraalset elementi.

### 5.5. Võimalikud arengusuunad

Kuna käesolev töö keskendus nii ühendite disainile, sünteesile kui ka biokeemilisele iseloomustamisele, on antud tööle põhinedes võimalikud mitmed olulised edasimineked.

Ühendite disainis võiks lõplikult kinnitada ARC-tüüpi inhibiitorite *L*-aminohappelise kiraalse elemendi käitumist ROCK-i suunalise selektiivsuse tagajana. Näiteks oleks tarvilik teostada lisaeksperimente, proovides varieerida ka teiste sünteesitud ühendite kiraalsete elementide stereokonfiguratsiooni ja võrrelda seejärel saadud ühendite afiinsust ROCK-II ja PKAc suhtes. Lisaks on võimalik antud töö käigus sünteesitud märkimisväärse ROCK-i selektiivsusega inhibiitoreid **VIII** ja **IX** kasutada sondidena ROCK-i uuringutes.

Ühendi **ARC-3002** afiinsuse ja selektiivsuse edasiseks suurendamiseks tasuks varieerida linkerit struktuuri, samuti kiraalse elemendi stereokonfiguratsiooni ning muuta ka nukleosiidses osas (st Fasudili jäägis) asendusrühmi. Nimelt on eelnevalt on avaldatud, et muutes Fasudili piperasiinifragmendi asendajaid, saab suurendada ühendi afiinsust ja selektiivsust ROCK-II-le [93]. Seega oleks perspektiivikas kasutada erinevaid Fasudili derivaate nukleosiidse fragmendina ROCK-i selektiivsete bisubstraatsete inhibiitorite struktuuris.

Viimaks, kuna **ARC-3002** omas märkimisväärset afiinsust ja selektiivsust ROCK-II-le võrreldes PKAc-ga, tuleks keskenduda aine edasisele iseloomustamisele. Näiteks võiks iseloomustada **ARC-3002** afiinsust teiste kinaaside suhtes, testida rakkuminemisvõimet, mõõta ühendi toksilisust ning jälgida paiknemist rakkudes, kui **ARC-3002** on konjugeeritud fluorestsentsvärviga.

## 6. KOKKUVÕTE

PK-de poolt katalüüsitud valkude fosforüülimine on eukarüootses rakus elutähtis protsess, kuna see võimaldab rakkudel reageerida nii rakusisetele kui ka -välistele signaalidele. Fosforüülimine toimib molekulaarse lülitina, muutes valksubstraatide võimet osaleda erinevates rakulistes protsessides. Kuna PK-del on niivõrd suur roll raku elutegevuses, takistab nende häirunud aktiivsus raku normaalset funktsioneerimist ja on seega seotud mitmete haigustega. Seepärast on PK-dest saanud oluline uurimisobjekt ning pidevalt töötatakse välja uusi kinaaside aktiivsuse reguleerimisele suunatud aineid, millest arvestatava osa moodustavad inhibiitorid.

Käesolevas töös disainiti uusi adensiini analoogide ja oligo-*D*-arginiini konjugaate (ARC-tüüpi aineid), mis sisaldasid H9 ja 2,2'-iminodietaanhapest koosnevat fragmenti ja oligo-*D*-arginiini ning neid ühendavat linkerit. Ainetel varieeriti peptiidse osa arginiinijääkide arvu ning linkerit struktuuri. Süntees viidi läbi, kasutades kombineeritud tahkefaassünteesi ja sünteesi lahuses. Sünteesitud ainete biokeemilisel iseloomustamisel kasutati fluorestsentsi anisotropia ja luminescentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinevaid meetodeid.

Antud tööst selgus, et linkereid eraldava elemendi kiraalsust mõjutab selektiivsust ROCK-i ja PKAc vahel, kusjuures *L*-aminohappejääk suurendab suhtelist afiinsust ROCK-ile. Kõige efektiivsemate H9-Ida fragmenti sisaldavate ühendite afiinsus jäi subnanomolaarsesse piirkonda. Lisaks iseloomustati varem sünteesitud ARC-tüüpi inhibiitorit **ARC-3002**, mis sisaldas ROCK-i selektiivse inhibiitori Fasudili fragmenti. Antud inhibiitori biokeemilisel iseloomustamisel kasutati edukalt LUM-meetodi modifitseeritud varianti, kus luminescentssondi võeti võrreldes ensüümiga suures ülehulgas. Mõõtmistulemustest selgus, et **ARC-3002** on uudne ROCK-i inhibiitor, mis omab kõrget afiinsust ja selektiivsust ROCK-II-le, võrreldes PKAc-ga. Leiti, et **ARC-3002** on isegi suurem selektiivsus ROCK-i suhtes kui Fasudilil endal.

Käesoleva töö baasil on võimalik edasi uurida *L*-aminohappelise kiraalse elemendi mõju ROCK-i selektiivsuse tagajana. Lisaks on võimalik sünteesitud ROCK-i selektiivseid inhibiitoreid **VIII** ja **IX** kasutada sondidena ROCK-i jaoks. Tuleks jätkata **ARC-3002** täpsemat iseloomustamist keerulisemates looduslikes süsteemides ning teostada vajadusel aine edasist struktuurset modifitseerimist. Viimaks, antud töös iseloomustatud LUM-meetodi modifitseeritud varianti saab kasutada edaspidi kõrge afiinsusega ühendite iseloomustamiseks.

## 7. SUMMARY

### Isoquinoline-derived bisubstrate inhibitors of protein kinases

Protein kinases catalyze phosphorylation, the transfer of the  $\gamma$ -phosphoryl group from ATP to a protein/peptide substrate. The phosphorylation reaction serves as a molecular switch, increasing or decreasing the ability of the substrate protein to participate in different cellular processes. Phosphorylation of proteins is a life-sustaining mechanism in the eukaryotic cells, as it allows cells to respond to both internal as well as external signals. As protein kinases have the crucial role in the cell life, their abnormal functioning is connected to a variety of diseases. Consequently, a lot of effort has been made in development of protein kinase targeting compounds, including inhibitors.

The conjugates of an adenosine analogue and oligo-arginine (ARCs) are bisubstrate inhibitors which incorporate an ATP-mimicking fragment (adenosine derivative or ATP-competitive inhibitor) and a peptide substrate-mimicking fragment (oligo-arginine); these fragments are connected via a hydrophobic linker. In the present work, the novel ARCs were developed which utilize H9 and 2,2'-iminodiacetic acid conjugate as the fragment binding to the ATP-site of protein kinases. The structure of the linker and the number of arginine residues in peptidic fragment were varied; in addition, *L*- or *D*-amino acids were used as chiral spacers that separate linker moieties. Subsequently, the biochemical evaluation of new inhibitors towards cAMP-dependent protein kinase and Rho-dependent protein kinase was carried out using methods based on the detection of fluorescence anisotropy and long lifetime luminescence intensity.

This work confirmed the previous notion that the use of *L*-amino acids at the position corresponding to the chiral spacer in ARCs might represent a structural feature affecting the selectivity of compounds towards ROCK *versus* PKAc. Remarkably, the most potent compounds of the series (compounds **VIII** and **IX**) possessed subnanomolar to low nanomolar affinity towards the target protein kinases.

In addition, several of the previously synthesized high-affinity ARCs were characterized by the method which allowed more precise determination of inhibitor binding properties to the kinase. Here, the major achievement was evaluation of **ARC-3002** (conjugate of the inhibitor Fasudil with oligoarginine) by the modified version of the LUM-assay where the luminescent probe was applied at a high concentration as compared to the concentration of the kinase. The established picomolar  $K_d$  value of **ARC-3002** towards ROCK-II and its high selectivity

towards ROCK-II *versus* PKAc (160-fold) featured **ARC-3002** as an outstanding ROCK-II inhibitor.

On the basis of this thesis, it is possible to further optimize the structure of newly developed inhibitors as well as envisage possibilities for application of these compounds in studies of protein kinases in complex biological systems. In the first place, it would be of special interest to further investigate the effect of *L*-amino acid chiral element on selectivity of inhibitors towards ROCK. Secondly, compounds **VIII**, **IX** and **ARC-3002** and the possible derivatives of those should further be characterized in detail as the biologically active probes (e.g., in cellular studies). Finally, the modified version of LUM-assay established in the present work can be successfully used for characterization of other high-affinity inhibitors of a variety of basophilic protein kinases.

## **8. TÄNUAVALDUSED**

Soovin tänada oma juhendajaid, Darja Lavõginat ja Asko Uri, sisuka õpetamise, igakülgse toe ning abi eest antud töö koostamisel.

Eraldi tahaksin tänada Angela Vaasat mitmekülgse abi ja õpetamise eest sünteesitud ainete biokeemilisel iseloomustamisel.

Lisaks suured tänud Erki Enkvistile ühendite mass-spektroskoopiliste mõõtmiste ja Gerda Raidarule kromatograafilise puhastamise eest.

Tänan ka kõiki minu teisi kolleege laboris toetamise eest.



## 9. KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] Shugar, D. The NTP phosphate donor in kinase reactions: Is ATP a monopolist? *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 9–24.
- [2] Adams, J. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271–2290.
- [3] Johnson, L.N.; Lewis, R.J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2209–2242.
- [4] Kinnings, S.L.; Jackson, R.M. Binding site similarity analysis for the functional classification of the protein kinase family. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 318–329.
- [5] Pearce, L.R.; Komander, D.; Alessi, D.R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* **2010**, *11*, 9–22.
- [6] Cohen, P. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 309–315.
- [7] Cohen, P. Guidelines for the effective use of chemical inhibitors of protein function to understand their roles in cell regulation. *Biochem. J.* **2010**, *425*, 53–54.
- [8] Chico, L.K.; Van Eldik, L.J.; Watterson, D.M. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 892–909.
- [9] Zhang, J.; Yang, P.; Gray, N. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 28–39.
- [10] Bogoyevitch, M.A.; Barr, R.K.; Ketterman, A.J. Peptide inhibitors of protein kinases - discovery, characterisation and use. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1754*, 79–99.
- [11] Parang, K.; Cole, P.A. Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 145–57.
- [12] Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications. *ChemMedChem.* **2010**, *5*, 23–34.
- [13] Taylor, S.; Kim, C.; Cheng, C.; Brown, S. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1784*, 16–26.
- [14] Amano, M.; Nakayama, M.; Kaibuchi, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken).* **2010**, *67*, 545–554.
- [15] Shen, K.; Hines, A.C.; Schwarzer, D.; Pickin, K.A.; Cole, P.A. Protein kinase structure and function analysis with chemical tools. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1754*, 65–78.
- [16] Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **2002**, *298*, 1912–1934.

- [17] Schwartz, P.A.; Murray, B.W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 192–210.
- [18] Hanks, S.K.; Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576–596.
- [19] Arencibia, J.M.; Pastor-Flores, D.; Bauer, A.F.; Schulze, J.O.; Biondi, R.M. AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* Avaldamiseks vastu võetud, alates 21.03.2013 saadaval veebist, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.010>.
- [20] Kennelly, P.J.; Krebs, E.G. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15555–15558.
- [21] Kang, J.H.; Jiang, Y.; Toita, R.; Oishi, J.; Kawamura, K.; Han, A.; Moru, T.; Niidome, T.; Ishida, M.; Tatematsu, K.; Tanizawa, K.; Katayama, Y. Phosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and C. *Biochimie.* **2007**, *89*, 39–47.
- [22] Smith, C.M.; Radzio-Andzelm, E.; Akamine, P.; Taylor, S.S. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Mol. Biol.* **1999**, *71*, 313–341.
- [23] Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G. An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3763–3765.
- [24] Skålhegg, B.S.; Funderud, A.; Henanger, H.H.; Hafte, T.T.; Larsen, A.C.; Kvissel, A.K.; Eikver, S.; Ørstavik, S. Protein kinase A (PKA) - a potential target for therapeutic intervention of dysfunctional immune cells. *Curr. Drug Targets.* **2005**, *6*, 655–664.
- [25] Shabb, J.B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2381–2411.
- [26] Kostenko, S.; Johannessen, M.; Moens, U. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell. Signal.* **2009**, *21*, 712–718.
- [27] S.S. Taylor, P. Zhang, J.M. Steichen, M.M. Keshwani, A.P. Kornev, PKA: Lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta.* Avaldamiseks vastu võetud, alates 25.03.2013 saadaval veebist, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.010>.
- [28] Pflug, A.; de Oliveira, T.M.; Bossemeyer, D.; Engh, R.A. Mutants of protein kinase A that mimic the ATP-binding site of Aurora kinase. *Biochem. J.* **2011**, *440*, 85–93.
- [29] Yeaman, S.J.; Cohen, P.; Watson, D.C.; Dixon, C.H. The substrate specificity of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase of rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* **1977**, *162*, 411–421.

- [30] Parker, P.J.; Aitken, A.; Bilham, T.; Embi, N.; Cohen, P. Amino acid sequence of a region in rabbit skeletal muscle glycogen synthase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **1981**, *123*, 332–336.
- [31] Murray, K.J.; El-Maghrabi, M.R.; Kountz, P.D.; Lukasqli, T.J.; Soderlingll, T.R.; Pilgis, S.J. Amino acid sequence of the phosphorylation site of rat liver. **1984**, *259*, 7673–7681.
- [32] Cohen, P.; Rylatt, D.B.; Nimmo, G.A. The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Lett.* **1977**, *76*, 182–186.
- [33] Sands, W.A.; Palmer, T.M. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 460–466.
- [34] Pidoux, G.; Taskén, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J. Mol. Endocrinol.* **2010**, *44*, 271–284.
- [35] Liao, J.K.; Seto, M.; Noma, K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2007**, *50*, 17–24.
- [36] Shimokawa, H.; Rashid, M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 296–302.
- [37] Riento, K.; Ridley, A.J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, *4*, 446–456.
- [38] Murthy, K.S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut., *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 345–374.
- [39] Hahmann, C.; Schroeter, T. Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 171–177.
- [40] Parri, M.; Chiarugi, P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell. Commun. Signal.* **2010**, *8*, 23.
- [41] Jacobs, M.; Hayakawa, K.; Swenson, L.; Bellon, S.; Fleming, M.; Taslimi, P.; Doran, J. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 260–268.
- [42] Somlyo, A.P.; Somlyo, A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* **2000**, *522*, 177–185.
- [43] Shi, J.; Wei, L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch. Immunol. Ther. Ex.* **2007**, *55*, 61–75.
- [44] Amano, M.; Fukata, Y.; Kaibuchi, K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 44–51.
- [45] Taylor, S.S.; Yang, J.; Wu, J.; Haste, N.M.; Anand, G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Rev. Lit. Am.* **2004**, *1697*, 259–269.

- [46] Sessions, E.H.; Yin, Y.; Bannister, T.D.; Weiser, A.; Griffin, E.; Pocas, J.; Cameron, M.D.; Ruiz, C.; Lin, L.; Schürer, S.C.; Schröter, T.; LoGrasso, P.; Feng, Y. Benzimidazole- and benzoxazole-based inhibitors of Rho kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6390–6393.
- [47] Breitenlechner, C.; Gassel, M.; Hidaka, H.; Kinzel, V.; Huber, R.; Engh, R.A.; Bossemeyer, D. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P. *Structure*. **2003**, *11*, 1595–1607.
- [48] Bonn, S.; Herrero, S.; Breitenlechner, C.B.; Erlbruch, A.; Lehmann, W.; Engh, R.A.; Gassel, M.; Bossemeyer, D. Structural analysis of protein kinase A mutants with Rho-kinase inhibitor specificity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24818–24830.
- [49] Madhusudan, S.; Trafny, E.A.; Xuong, N.H.; Adams, J.A.; Ten Eyck, L.F.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 176–187.
- [50] Parang, K.; Sun, G. Design strategies for protein kinase inhibitors. *Curr. Opin. Drug Di. De.* **2004**, *7*, 617–629.
- [51] Fischer, P.M. The design of drug candidate molecules as selective inhibitors of therapeutically relevant protein kinases. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1563–1583.
- [52] Scapin, G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov. Today*. **2002**, *7*, 601–611.
- [53] Nishikawa, M.; Hidaka, H. Role of calmodulin in platelet aggregation. Structure-activity relationship of calmodulin antagonists. *J. Clin. Invest.* **1982**, *69*, 1348–1355.
- [54] Hidaka, H.; Inagaki, M.; Kawamoto, S.; Sasaki, Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*. **1984**, *23*, 5036–5041.
- [55] Daaka, Y.; Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. **1997**, *390*, 88–91.
- [56] Wang, L.; Zhu, Y.; Sharma, K. Transforming growth factor-beta1 stimulates protein kinase A in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8522–8527.
- [57] Ono-Saito, N.; Niki, I.; Hidaka, H. H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmacol. Therapeut.* **1999**, *82*, 123–131.
- [58] Davies, S.P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95–105.
- [59] Engh, R.A.; Girod, A.; Kinzel, V.; Huber, R.; Bossemeyer, D. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26157–26164.
- [60] Eldar-Finkelman, H.; Eisenstein, M. Peptide inhibitors targeting protein kinases. *Curr. Pharm. Design.* **2009**, *15*, 2463–2470.

- [61] Masterson, L.R.; Mascioni, A.; Traaseth, N.J.; Taylor, S.S.; Veglia, G. Allosteric cooperativity in protein kinase A. *PNAS*. **2008**, *105*, 506–511.
- [62] Guichard, G.; Benkirane, N.; Zeder-Lutz, G.; van Regenmortel, M.H.; Briand, J.P.; Muller, S. Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics. *PNAS*. **1994**, *91*, 9765–9769.
- [63] Walsh, D.A.; Ashby, C.D.; Gonzalez, C.; Calkins, D.; Fischer, E.H.; Krebs, E.G. Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1977–1985.
- [64] Wolfenden, R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. **1972**, *5*, 10–18.
- [65] Lienhard, G.E.; Secemski, I.I. P1,P5-Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1121–1123.
- [66] Schramm, V.L. Enzymatic transition states, transition-state analogs, dynamics, thermodynamics, and lifetimes. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 703–732.
- [67] Saxty, G.; Woodhead, S.J.; Berdini, V.; Davies, T.G.; Verdonk, M.L.; Wyatt, P.G.; Boyle, R.G.; Barford, D.; Downham, R.; Garrett, M.D.; Carr, R.A. Identification of inhibitors of protein kinase B using fragment-based lead discovery. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2293–2296.
- [68] Kane, R.S. Thermodynamics of multivalent interactions: influence of the linker. *Langmuir*. **2010**, *26*, 8636–8640.
- [69] Green, K.D.; Pflum, M.K.H. Kinase-catalyzed biotinylation for phosphoprotein detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10–11.
- [70] Traxler, P.M.; Wacker, O.; Bach, H.L.; Geissler, J.F.; Kump, W.; Meyer, T.; Regenass, U.; Roesel, J.L.; Lydon, N. Sulfonylbenzoyl-nitrostyrenes: potential bisubstrate type inhibitors of the EGF-receptor tyrosine protein kinase. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2328–2337.
- [71] Ricouart, A.; Gesquiere, J.C.; Tartar, A.; Sergheraert, C. Design of potent protein kinase inhibitors using the bisubstrate approach. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 73–78.
- [72] Vaasa, A.; Lust, M.; Terrin, A.; Uri, A.; Zaccolo, M. Small-molecule FRET probes for protein kinase activity monitoring in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2010**, *397*, 750–755.
- [73] Uri, A.; Lust, M.; Vaasa, A.; Lavogina, D.; Viht, K.; Enkvist, E. Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*. **2010**, *1804*, 541–546.
- [74] Räägel, H.; Lust, M.; Uri, A.; Pooga, M. Adenosine-oligoarginine conjugate, a novel bisubstrate inhibitor, effectively dissociates the actin cytoskeleton. *FEBS J.* **2008**, *275*, 3608–3624.

- [75] Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2008**, *60*, 598–607.
- [76] Vaasa, A.; Ligi, K.; Mohandessi, S.; Enkvist, E.; Uri, A.; Miller, L.W. Time-gated luminescence microscopy with responsive nonmetal probes for mapping activity of protein kinases in living cells. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8595–8597.
- [77] Enkvist, E.; Lavogina, D.; Raidaru, G.; Vaasa, A.; Viil, I.; Lust, M.; Viht, K.; Uri, A. Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7150–7159.
- [78] Lavogina, D.; Lust, M.; Viil, I.; König, N.; Raidaru, G.; Rogozina, J.; Enkvist, E.; Uri, A.; Bossemeyer, D. Structural analysis of ARC-type inhibitor (ARC-1034) binding to protein kinase A catalytic subunit and rational design of bisubstrate analogue inhibitors of basophilic protein kinases. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 308–321.
- [79] Enkvist, E.; Kriisa, M.; Roben, M.; Kadak, G.; Raidaru, G.; Uri, A. Effect of the structure of adenosine mimic of bisubstrate-analog inhibitors on their activity towards basophilic protein kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6098–6101.
- [80] Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 85–93.
- [81] Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1052–1062.
- [82] Kasari, M.; Padrik, P.; Vaasa, A.; Saar, K.; Leppik, K.; Soplepmann, J.; Uri, A. Time-gated luminescence assay using nonmetal probes for determination of protein kinase activity-based disease markers. *Anal. Biochem.* **2012**, *422*, 79–88.
- [83] Pflug, A.; Rogozina, J.; Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A.; Engh, R.A.; Bossemeyer, D. Diversity of bisubstrate binding modes of adenosine analogue-oligoarginine conjugates in protein kinase a and implications for protein substrate interactions. *J. Mol. Biol.* **2010**, *403*, 66–77.
- [84] Enkvist, E.; Raidaru, G.; Vaasa, A.; Pehk, T.; Lavogina, D.; Uri, A. Carbocyclic 3'-deoxyadenosine-based highly potent bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5336–5339.
- [85] Enkvist, E.; Viht, K.; Bischoff, N.; Vahter, J.; Saaver, S.; Raidaru, G.; Issinger, O.G.; Niefind, K.; Uri, A. A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8645–8653.
- [86] Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [87] Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed; Freeman: New York, 2005, pp. 104–106.

- [88] Attardi, M.E.; Falchi, A; Taddei, M. A sensitive visual test for detection of OH groups on resin. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7395–7399.
- [89] Mařík, J; Song, A.; Lam, K.S. Detection of primary aromatic amines on solid phase. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4319–4320.
- [90] Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [91] Chan, W.C.; White, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, 2000.
- [92] Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P.P.; Krajewski, K.; Saito, N.G.; Stuckey, J.A.; Wang, S. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- [93] LoGrasso, P.V.; Feng, Y. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 704–723.

## 10. LISAD

**Lisa 1.** ARC-tüüpi inhibiitorite koodid ja struktuurid

**Lisa 2.** Massispektromeetrilised andmed

**Lisa 3.** FA- ja LUM-meetodi sidumis- ja väljatõrjumiskõverate näited

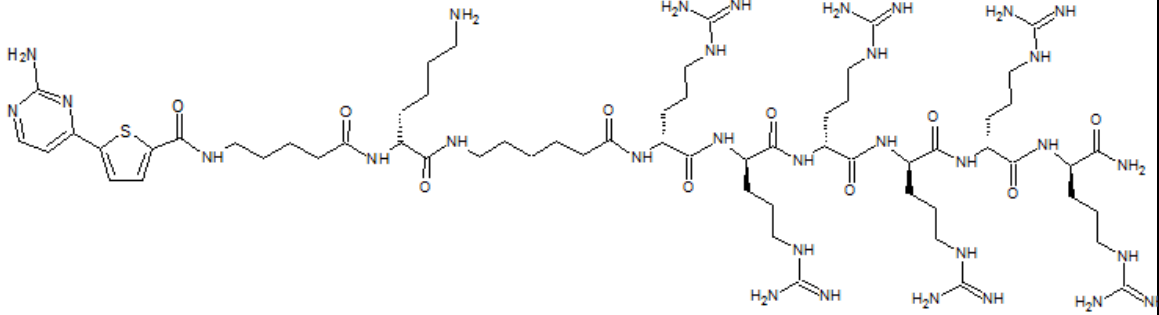
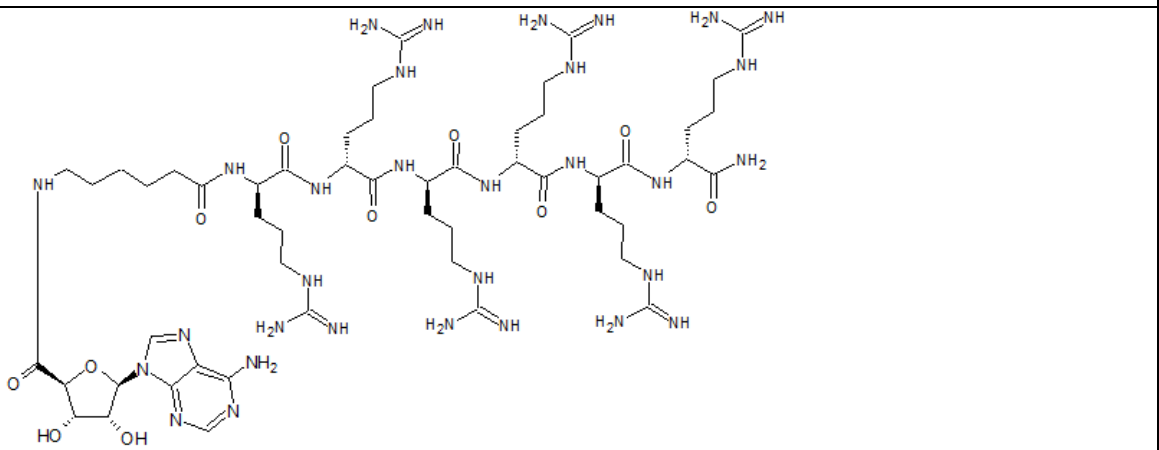
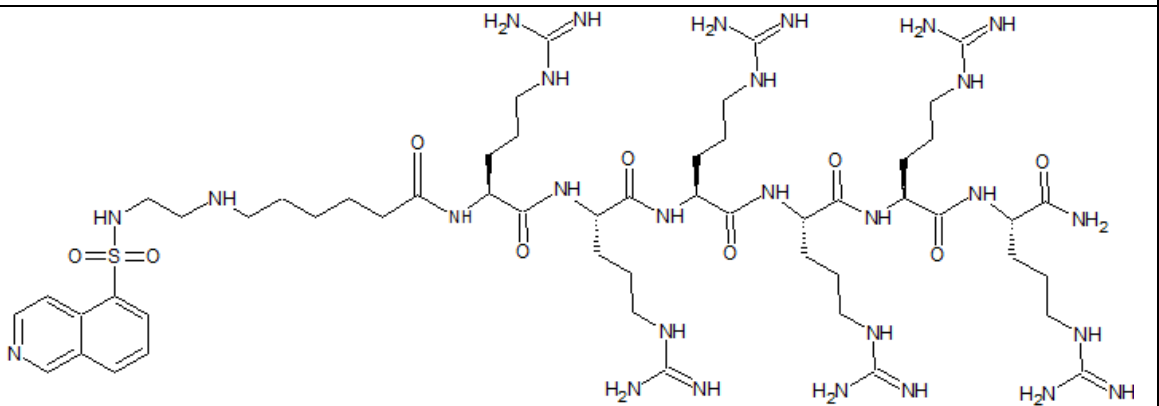
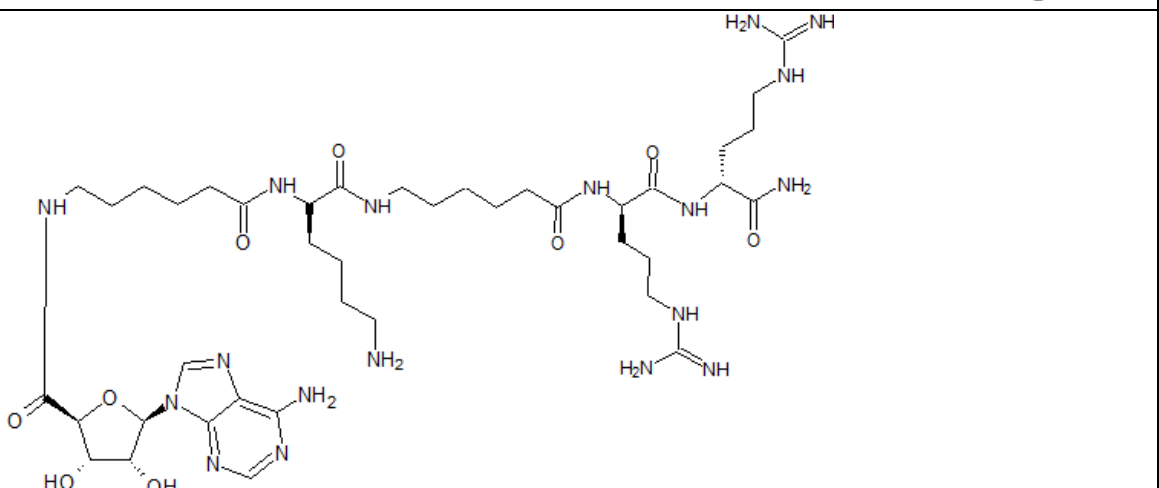
**Lisa 4.** Käesoleva töö eksperimentaalandmeid sisaldav publikatsioon

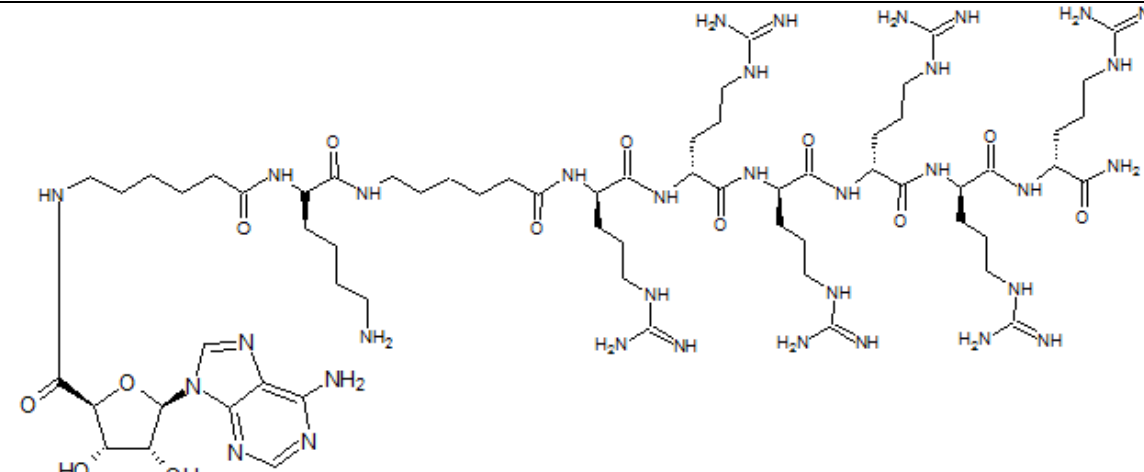
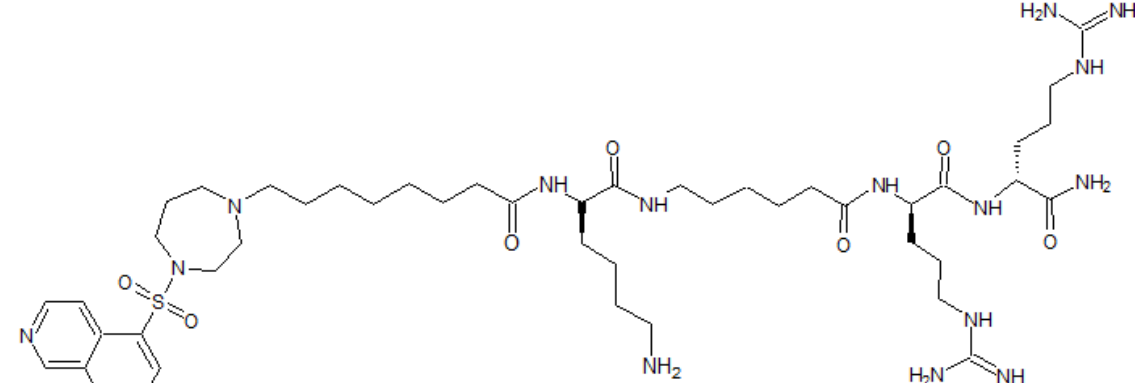
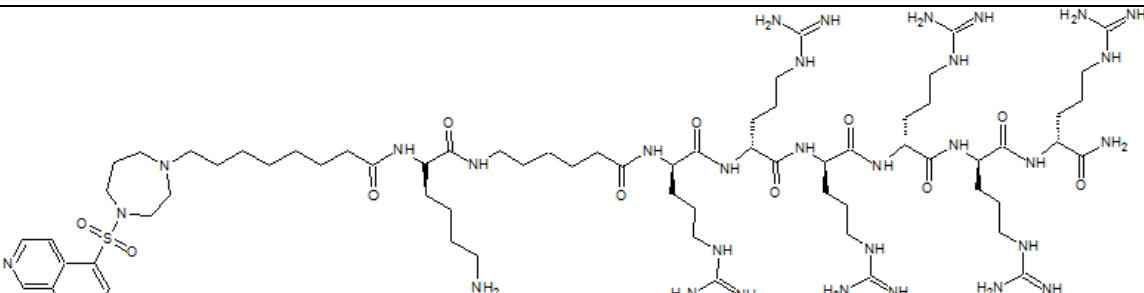
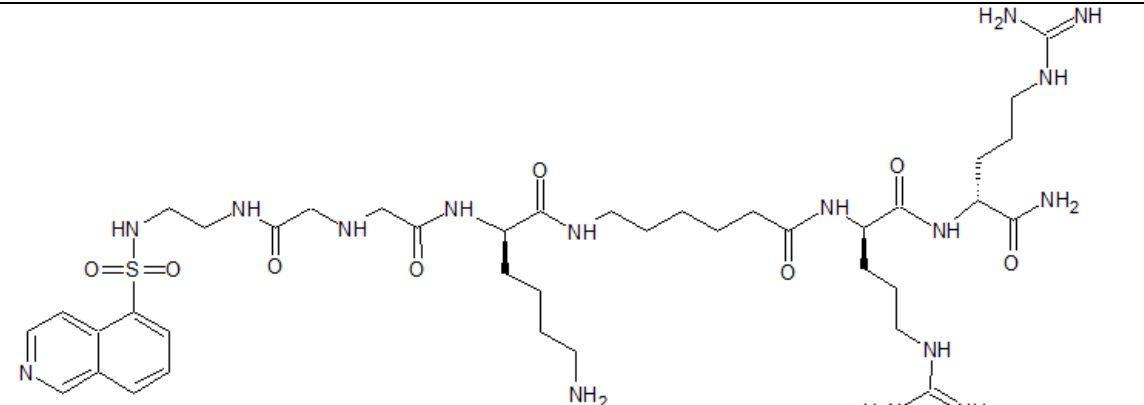
Lavogina, D.; Kalind, K.; Bredihhina, J.; Hurt, M.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Enkvist, E.

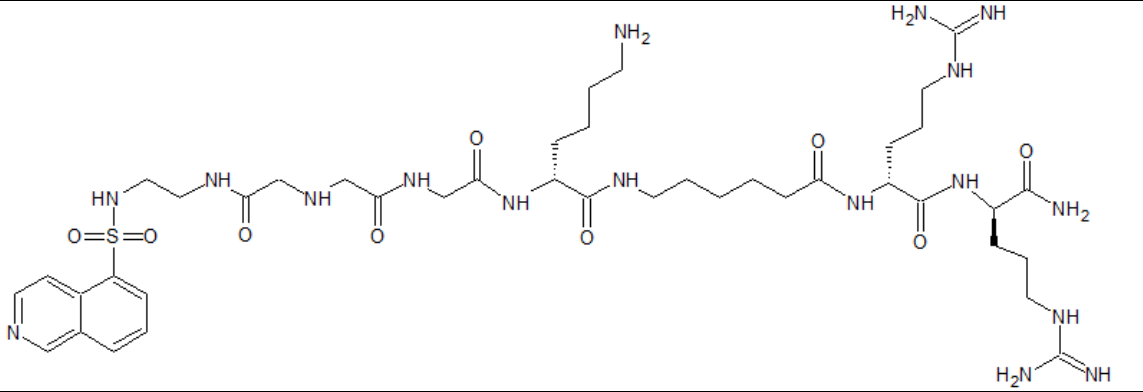
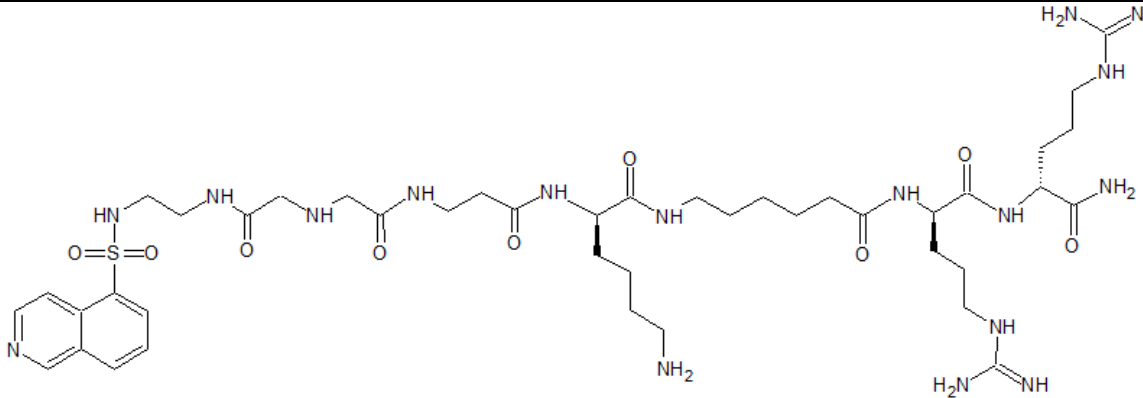
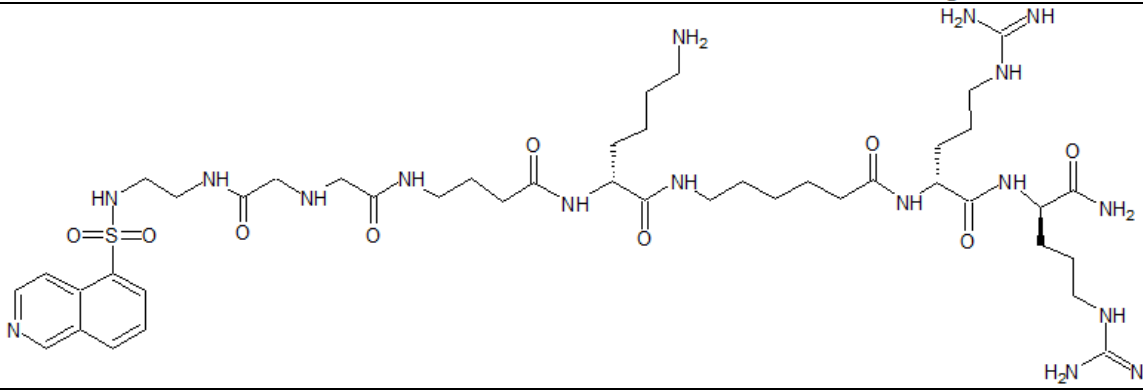
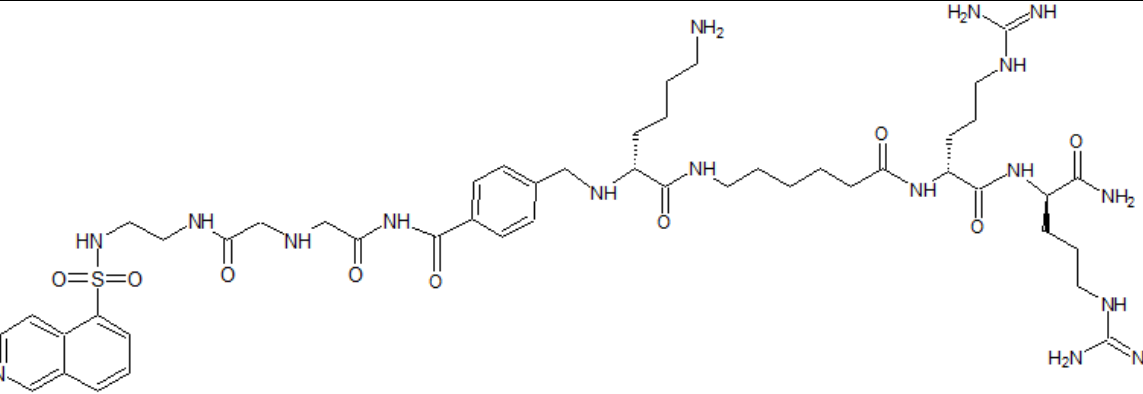
Conjugates of 5-isoquinolinesulfonylamides and oligo-D-arginine possess high affinity and selectivity towards Rho kinase (ROCK). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3425–3430.

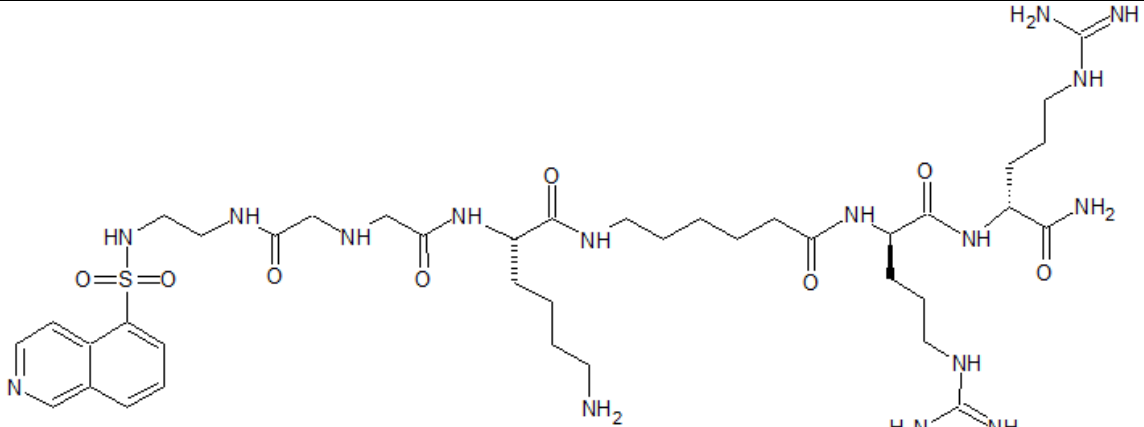
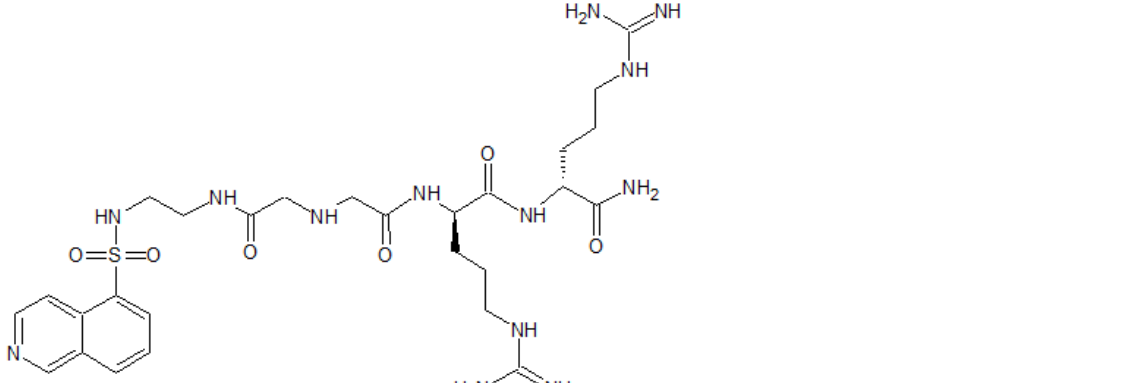
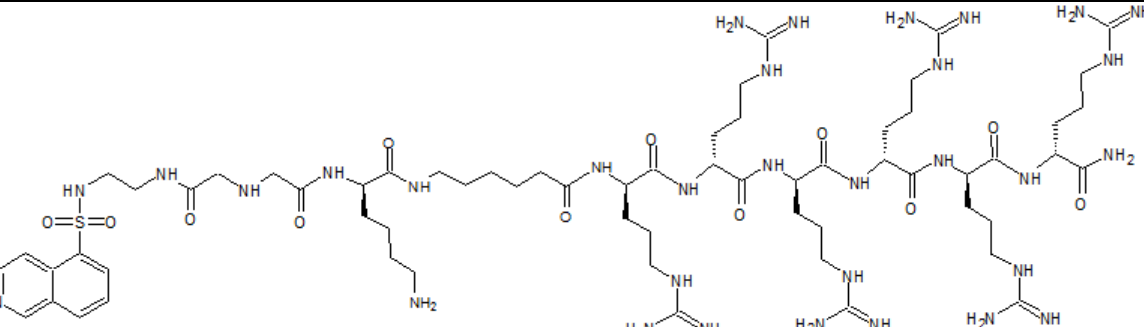
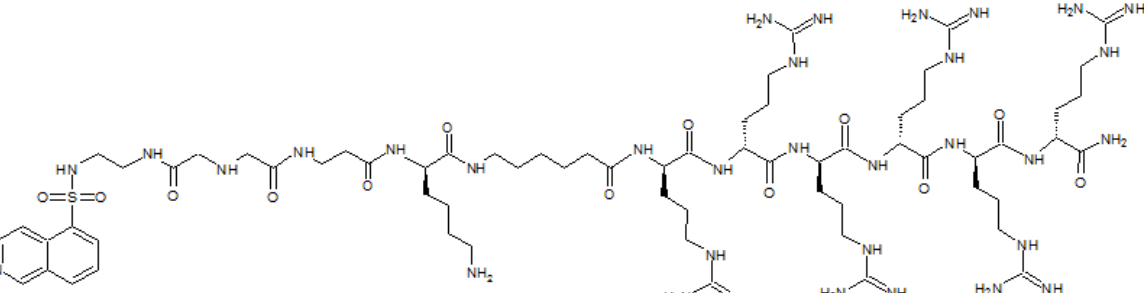
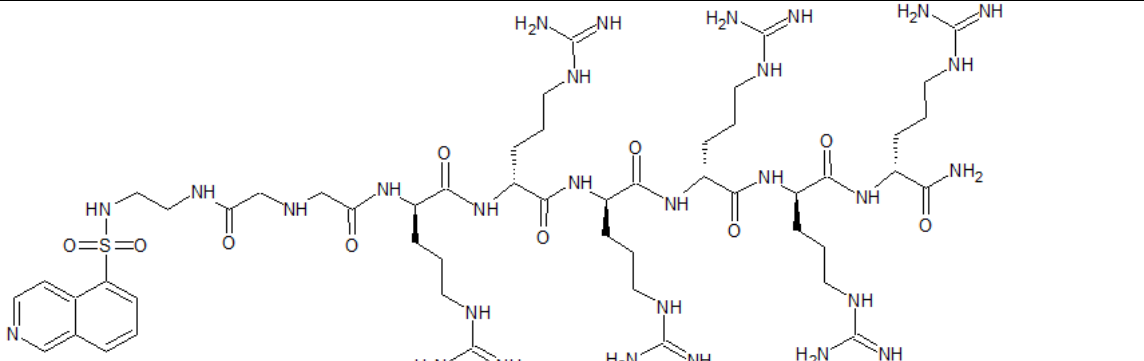


Lisa 1. ARC-tüüpi inhibiitorite koodid ja struktuurid

| Ühendi nr | Kood     | Struktuur  |
|-----------|----------|--|
|           | ARC-664  |    |
|           | ARC-902  |   |
|           | ARC-903  |  |
|           | ARC-1012 |  |

|          |                 |  |
|----------|-----------------|--|
|          | <b>ARC-1028</b> |    |
|          | <b>ARC-3000</b> |    |
|          | <b>ARC-3002</b> |  |
| <b>I</b> | <b>ARC-3005</b> |  |

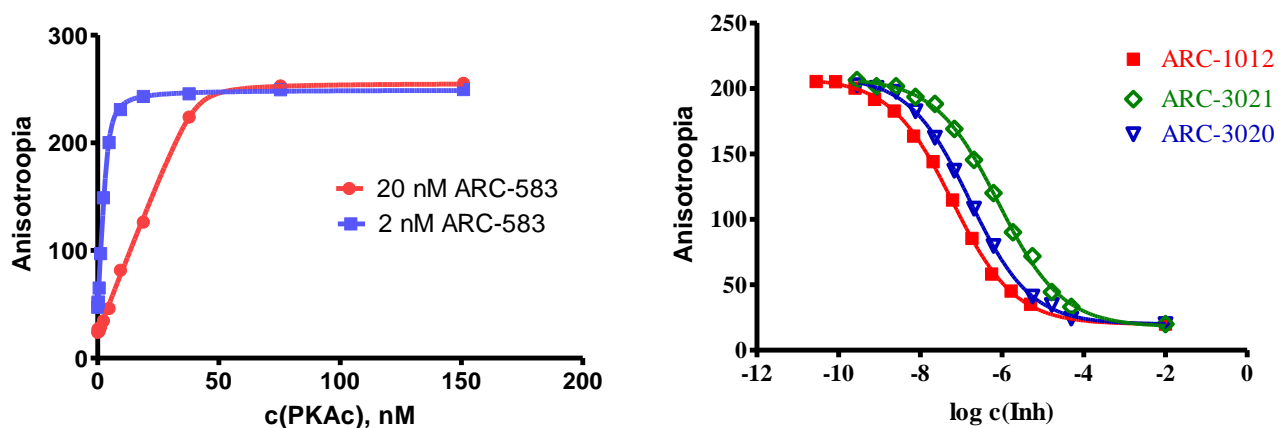
|     |          |  |
|-----|----------|--|
| II  | ARC-3006 |  <p>Chemical structure of ARC-3006: A complex molecule featuring a quinoline-2-sulfonyl group at the N-terminus of a peptide chain. The chain includes several amide bonds, a long aliphatic segment, and two guanidinoethyl side chains. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p> |
| III | ARC-3008 |  <p>Chemical structure of ARC-3008: Similar to ARC-3006, but with a different arrangement of the peptide backbone and side chains, including a guanidinoethyl group and a long aliphatic segment.</p>  |
| IV  | ARC-3007 |  <p>Chemical structure of ARC-3007: Features a quinoline-2-sulfonyl group and a peptide chain with a long aliphatic segment and a guanidinoethyl side chain.</p>  |
| V   | ARC-3022 |  <p>Chemical structure of ARC-3022: Includes a quinoline-2-sulfonyl group and a peptide chain with a long aliphatic segment and a guanidinoethyl side chain, differing in stereochemistry from the other compounds.</p>  |

|      |          |  |
|------|----------|--|
| VI   | ARC-3023 |    |
| VII  | ARC-3009 |    |
| VIII | ARC-3021 |   |
| IX   | ARC-3020 |  |
| X    | ARC-3010 |  |

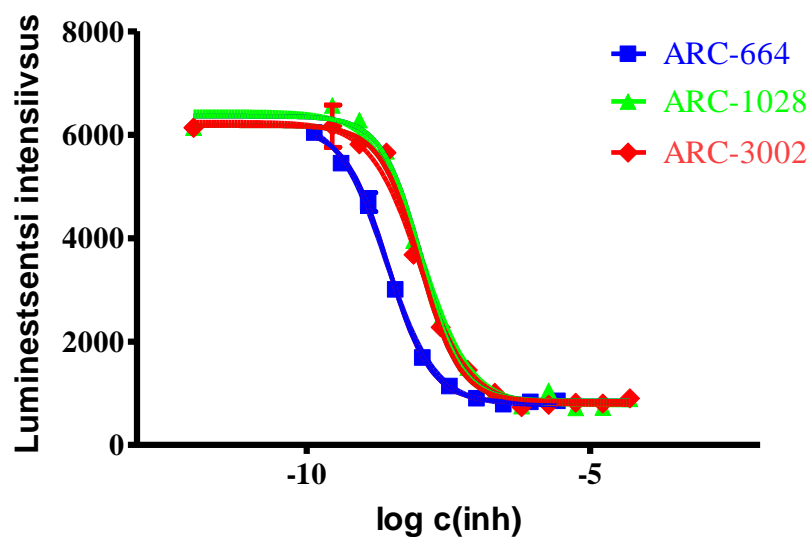
## Lisa 2. Massispektromeetrilised andmed

| <i>Ühendi nr</i> | <i>Kood</i>     | <i>MALDI MS [M + H<sup>+</sup>]</i> |                         |
|------------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------|
|                  |                 | <b>arvutatud</b>                    | <b>eksperimentaalne</b> |
| I                | <b>ARC-3005</b> | 920.11                              | 920.54                  |
| II               | <b>ARC-3006</b> | 977.16                              | 977.22                  |
| III              | <b>ARC-3008</b> | 991.19                              | 990.02                  |
| IV               | <b>ARC-3007</b> | 1005.21                             | 1004.55                 |
| V                | <b>ARC-3022</b> | 1053.26                             | 1054.07                 |
| VI               | <b>ARC-3023</b> | 920.11                              | 920.61                  |
| VII              | <b>ARC-3009</b> | 678.78                              | 678.91                  |
| VIII             | <b>ARC-3021</b> | 1544.85                             | 1545.81                 |
| IX               | <b>ARC-3020</b> | 1615.93                             | 1616.30                 |
| X                | <b>ARC-3010</b> | 1302.52                             | 1301.70                 |

### Lisa 3. FA- ja LUM-meetodi sidumis- ja väljatõrjumiskõverate näited



Vasakul graafikul on toodud PKAc aktiivse kontsentratsiooni määramine FA sidumismeetodil. Tiitrimisel kasutati fluorestsentssond **ARC-583** (lõppkontsentratsioon 2 nM või 20 nM). Paremal graafikul kujutatakse ARC-583 (2 nM) väljatõrjumist selle kompleksist PKAc-ga (3 nM) mitte-luminestseeruvate inhibiitorite poolt (koodid toodud graafikul).



**ARC-1063** (lõppkontsentratsioon 100 nM) väljatõrjumine selle kompleksist ROCK-II-ga (1.5 nM) mitte-luminestseeruvate inhibiitorite **ARC-664**, **ARC-1028** ja **ARC-3002** poolt. Graafik põhineb kahe mõõtmise keskmistatud andmetel.

**Lisa 4. Käesoleva töö eksperimentaalandmeid sisaldav publikatsioon**

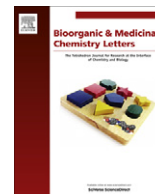
Lavogina, D.; Kalind, K.; Bredihhina, J.; Hurt, M.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Enkvist, E.

Conjugates of 5-isoquinolinesulfonylamides and oligo-D-arginine possess high affinity and selectivity towards Rho kinase (ROCK). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3425–3430.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

## Conjugates of 5-isoquinolinesulfonylamides and oligo-D-arginine possess high affinity and selectivity towards Rho kinase (ROCK)

Darja Lavogina, Katrin Kalind, Jevgenia Bredihhina, Madis Hurt, Angela Vaasa, Marje Kasari, Erki Enkvist, Gerda Raidaru, Asko Uri\*

Institute of Chemistry, University of Tartu, Ravila 14a, 50411 Tartu, Estonia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 March 2012

Revised 27 March 2012

Accepted 28 March 2012

Available online 4 April 2012

#### Keywords:

Protein kinase

Rho kinase (ROCK)

Inhibitor

Isoquinoline

ARC

Luminescent probe

### ABSTRACT

In the present work, conjugates of 5-isoquinolinesulfonylamides and D-arginine-rich peptides were developed into highly potent inhibitors for basophilic protein kinases. Based on Hidaka's inhibitor H9, a generic fluorescent probe **ARC-1083** was constructed possessing subnanomolar dissociation constant towards several kinases of the AGC-group. Thereafter, Hidaka's inhibitor HA1077 or Fasudil was conjugated with oligo-D-arginine resulting in the compound **ARC-3002** revealing high affinity towards ROCK-II ( $K_d = 20$  pM) and over 160-fold selectivity compared to PKAc.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Protein kinases catalyze the transfer of the  $\gamma$ -phosphoryl group from ATP to a protein/peptide substrate. The phosphorylation reaction serves as a molecular switch, rendering the substrate protein the ability to participate in multiple cellular processes.<sup>1,2</sup> While the normal functioning of kinases is essential for the sustenance of life of an organism, errors in kinase expression or activation are connected to a variety of diseases.<sup>1,3,4</sup> Consequently, an increasing amount of effort has been targeted to the research on the regulation of kinase activity, giving stimulus for the intense development of kinase inhibitors.<sup>5</sup>

Protein kinase inhibitors are frequently classified into groups according to the site of kinase occupied by the compound. The majority of developed kinase inhibitors bind to the ATP-site of kinases, and these inhibitors are ATP-competitive. Generally, structural scaffolds of such inhibitors incorporate nitrogen-containing

aromatic ring systems, which on one hand serve as hydrogen bond donors or acceptors for kinase backbone amino acid residues, and on the other hand develop hydrophobic interactions with the ATP-site buried inside the kinase molecule.<sup>6,7</sup> One of the widely used nitrogen-containing aromatic scaffolds is an isoquinoline moiety, which for instance constitutes the major 'building block' of a subfamily of ATP-competitive kinase inhibitors termed Hidaka-series compounds or H-inhibitors<sup>8</sup> (Fig. 1). Several representatives of Hidaka's inhibitors are endowed with high affinity and inhibition potency towards Ser/Thr kinases, and the family of H-compounds includes both generic inhibitors with wide selectivity profiles (e.g., H9) as well as inhibitors with increased selectivity towards certain targets.<sup>9,10</sup> Among the latter compounds are H89 and Fasudil (HA1077): H89 has been widely used as a compound selective towards cAMP-dependent protein kinase (PKAc),<sup>11,12</sup> whereas Fasudil is the first Rho kinase (ROCK) inhibitor approved for clinical use.<sup>13,14</sup>

5-Isoquinolinesulfonylamide moiety has also been utilized as a fragment of bisubstrate inhibitors of kinases. Bisubstrate inhibitors incorporate two interlinked fragments that associate with the ATP-site and the protein/peptide substrate-site of a kinase, respectively.<sup>15</sup> The first bisubstrate inhibitors containing a H9 moiety as the ATP-site-targeted fragment were described by Ricouart et al. in 1991.<sup>16</sup> The compound with the highest inhibitory potency (Compound **17**) possessed inhibition  $IC_{50}$  value of 3 nM towards the catalytic subunit of PKAc and an  $IC_{50}$  value of 300 nM towards

**Abbreviations:** Abu, 4-aminobutanoic acid moiety; Adc, adenosine 4'-dehydroxymethyl-4'-carboxylic acid moiety; Ahx, 6-aminohexanoic acid moiety; Akt(PKB), protein kinase B; Apr, 3-aminopropionic acid moiety; ARC, adenosine analogue-oligoarginine conjugate; Ida, 2,2'-iminodiacetic acid moiety; Isn, 4-piperidinecarboxylic (isonipecotic) acid moiety; MSK, mitogen- and stress-activated protein kinase; p70S6K, p70 ribosomal S6 kinase; Pab, 4-aminobenzoic (para-aminobenzoic) acid moiety; Pamb, 4-amino(methylbenzoic) (para-aminomethylbenzoic) acid moiety; PKAc, cAMP-dependent protein kinase type  $\alpha$ ; PKC, protein kinase C; PKG, cGMP-dependent protein kinase; ROCK, Rho kinase (type II, unless otherwise indicated); SGK, serum and glucocorticoid-inducible kinase.

\* Corresponding author. Tel./fax: +372 737 5275.

E-mail address: [asko.uri@ut.ee](mailto:asko.uri@ut.ee) (A. Uri).





**Table 1**Structures of the conjugates containing an alkylated *N*-(2-aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide (H9) fragment, and their affinities towards PKAc

| Code                        | Structure   | Log IC <sub>50</sub> (PKAc) <sup>b</sup> (nM) | K <sub>d</sub> (PKAc) <sup>c</sup> (nM) |
|-----------------------------|---|---|---|
| <b>ARC-1012<sup>a</sup></b> | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                                  | −7.22 [0.04]                                  | <b>8.9<sup>d</sup></b>                  |
| <b>ARC-903<sup>a</sup></b>  | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C(=O)-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>             | −8.26 [0.04]                                  | <b>0.53</b>                             |
| <b>ARC-1067<sup>a</sup></b> | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Gly-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −5.95 [0.09]                                  | <b>170</b>                              |
| <b>ARC-1068<sup>a</sup></b> | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Apr-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −6.07 [0.12]                                  | <b>130</b>                              |
| <b>ARC-1069<sup>a</sup></b> | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Abu-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −6.18 [0.09]                                  | <b>90</b>                               |
| <b>Compound I</b>           | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −5.89 [0.14]                                  | <b>190</b>                              |
| <b>Compound II</b>          | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Pab-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −7.21 [0.09]                                  | <b>9.2</b>                              |
| <b>Compound III</b>         | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Isn-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                         | −6.95 [0.11]                                  | <b>16</b>                               |
| <b>Compound IV</b>          | H9-CH <sub>2</sub> C(=O)-Isn-Gly-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                     | −6.40 [0.19]                                  | <b>59</b>                               |
| <b>Compound V</b>           | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(=O)-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>             | −6.51 [0.07]                                  | <b>46</b>                               |
| <b>Compound VI</b>          | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> C(=O)-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>             | −7.46 [0.06]                                  | <b>5.0</b>                              |
| <b>Compound VII</b>         | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C(=O)-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> | −8.00 [0.19]                                  | <b>1.3</b>                              |

<sup>a</sup> Previously published compound.<sup>17,22,23</sup><sup>b</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with FA-assay<sup>24</sup> by displacement of fluorescent probe **ARC-583** (2 nM) from its complex with PKAc (3 nM).<sup>c</sup> Displacement constant K<sub>d</sub> values calculated with the aid of online calculator<sup>25</sup> (K<sub>D</sub> value of probe is given in the [Supplementary](#)).<sup>d</sup> K<sub>d</sub> value of 7.6 nM has been previously reported.<sup>22</sup>**Table 2**

Structures of conjugates containing a H9-Ida fragment, and affinities of the compounds towards PKAc and ROCK-II

| Code                        | Structure   | Log IC <sub>50</sub> (PKAc) <sup>b</sup> (nM) | K <sub>d</sub> (PKAc) <sup>c</sup> (nM) | Log IC <sub>50</sub> (ROCK-II) <sup>d</sup> (nM) | K <sub>d</sub> (ROCK-II) <sup>c</sup> (nM) |
|-----------------------------|---|---|---|--|--|
| <b>ARC-1012<sup>a</sup></b> | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                      | −7.22 [0.04]                                  | <b>8.9</b>                              | −6.79 [0.04]                                     | <b>7.0</b>                                 |
| <b>ARC-903<sup>a</sup></b>  | H9-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C(=O)-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> | −8.26 [0.04]                                  | <b>0.53</b>                             | −8.61 [0.07]                                     | <b>Below 0.5</b>                           |
| <b>Compound VIII</b>        | H9-Ida-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                       | −4.78 [0.20]                                  | <b>2500</b>                             | Over −4.5  | <b>nc</b>                                  |
| <b>Compound IX</b>          | H9-Ida-Gly-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | −4.72 [0.16]                                  | <b>2900</b>                             | Over −4.5  | <b>nc</b>                                  |
| <b>Compound X</b>           | H9-Ida-Apr-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | −5.26 [0.07]                                  | <b>820</b>                              | Over −4.5  | <b>nc</b>                                  |
| <b>Compound XI</b>          | H9-Ida-Abu-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                   | −4.63 [0.20]                                  | <b>3500</b>                             | Over −4.5  | <b>nc</b>                                  |
| <b>Compound XII</b>         | H9-Ida-Pamb-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                  | −4.77 [0.06]                                  | <b>2600</b>                             | −4.57 [0.15]                                     | <b>1200</b>                                |
| <b>Compound XIII</b>        | H9-Ida-(L-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                       | Over −4.5                                     | <b>nc</b>                               | −4.79 [0.12]                                     | <b>690</b>                                 |
| <b>Compound XIV</b>         | H9-Ida-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>                                   | −4.57 [0.20]                                  | <b>4100</b>                             | Over −4.5  | <b>nc</b>                                  |
| <b>Compound XV</b>          | H9-Ida-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                       | −6.07 [0.06]                                  | <b>130</b>                              | −7.46 [0.04]                                     | <b>1.5</b>                                 |
| <b>Compound XVI</b>         | H9-Ida-Apr-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                   | −6.79 [0.03]                                  | <b>24</b>                               | −7.75 [0.05]                                     | <b>~0.70</b>                               |
| <b>Compound XVII</b>        | H9-Ida-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>                                   | −6.10 [0.05]                                  | <b>120</b>                              | −6.82 [0.05]                                     | <b>6.4</b>                                 |

<sup>a</sup> Previously published compound.<sup>17,22</sup><sup>b</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with FA-assay by displacement of 2 nM fluorescent probe **ARC-583** from its complex with 3 nM PKAc.<sup>c</sup> Displacement constant K<sub>d</sub> values calculated with the aid of online calculator<sup>25</sup> (K<sub>D</sub> values of probes are given in the [Supplementary](#)).<sup>d</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with FA-assay by displacement of 2 nM fluorescent probe **ARC-1042** from its complex with 3 nM ROCK-II. nc, not calculated.

these compounds as compared to those containing a more flexible hydrophobic chain.

Previously, the strategy of linker elongation and introduction of a chiral spacer proved successful for conjugates containing Adc as the ATP-site targeting fragment, and **ARC-1012** was a very potent inhibitor of PKAc.<sup>22</sup> Therefore, **Compound VII** was synthesized, structurally resembling the previously reported compound **ARC-1012**. The affinity of **Compound VII** was indeed the highest within the first set of new compounds (K<sub>d</sub> value of 1.3 nM, thus 7-fold lower than that of **ARC-1012**). The latter result indicated that in case of a sufficiently long and flexible linker system, the binding mode of ARCs containing Adc and those containing H9 moiety may be similar.

Another set of conjugates ([Table 2](#)), also incorporating a *N*-(2-aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide (H9) moiety, was designed to position the protonated amino group as a donor of hydrogen bond further on from the 5-isoquinolinesulfonamide moiety. Such structural modification has been previously used to increase ROCK-selectivity of Fasudil derivatives.<sup>13,14</sup> The new design requested the application of a new synthetic strategy. H9 was acylated in solution with *N*-Boc protected 2,2'-iminodiacetic acid, and the product was attached to the peptide on solid phase. The deprotected 2,2'-iminodiacetic acid moiety (Ida) thus served as a linker or a linker fragment incorporating a secondary amine group that is protonated at close to neutral pH values. Such synthetic scheme shortened the last step of synthesis (3 h, compared to 15 h that was required for synthesis of **ARC-903** and its analogues) and increased the overall yield of synthesis from 10% to 30...40%.

None of the conjugates containing a H9-Ida moiety and two D-arginine residues in the peptidic fragment (**Compounds VIII–XIV**) possessed K<sub>d</sub> values as low as these of **ARC-1012** in assays with both PKAc and ROCK-II. Interestingly, the replacement of D-Lys following the Ida moiety with L-Lys (**Compounds VIII** and **XIII**, respectively) resulted in dramatic drop of affinity towards PKAc, whereas the affinity towards ROCK-II was even improved. Previously, it was demonstrated for Adc-containing compounds that the substitution of the L-amino acid chiral spacer for the D-counterpart substantially diminished the affinity of compounds towards PKAc.<sup>22</sup> It is thus remarkable that the latter trend was observed also for the novel IQS-containing ARCs in assays with PKAc. Importantly, taking into consideration the data for the novel ARCs in assays with ROCK-II, the use of L-amino acids at the position corresponding to the chiral spacer in ARCs might represent a structural feature affecting selectivity of compounds towards ROCK versus PKAc. Further investigation will be needed to confirm the latter notion.

As expected, when the number of D-arginine residues in the peptidic fragment of H9-based conjugates of [Table 2](#) was increased to six (**Compounds XV–XVII**), the affinity of the compounds towards PKAc increased by 30...40-fold; still, none of the latter inhibitors possessed as high affinity as that of **ARC-903**. The effect of increasing number of D-arginine residues was even more pronounced in case of ROCK, where **Compounds XV–XVII** revealed 100-fold lower K<sub>d</sub> values than their counterparts containing two D-arginine residues (i.e., **Compounds VIII, X** and **XIV**, respectively). From this point of view, an especially interesting inhibitor was

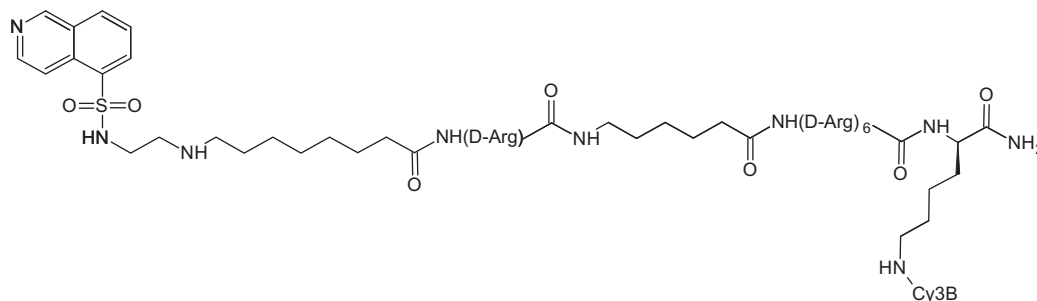


Figure 2. Structure of **Compound XVIII** (**ARC-1083**).

**Compound XV**, which possessed nearly 90-fold selectivity towards ROCK-II over PKAc. Another important achievement was the subnanomolar  $K_d$  value of **Compound XVI** towards ROCK-II, comparable to that of **ARC-903** (however, the latter compound showed high affinity also towards PKAc). Overall, while the compounds containing H9 followed by an alkyl linker might be considered as **ARC-903** analogues (the latter compound was previously shown to inhibit many kinases in a panel<sup>17</sup>), the inhibitors incorporating H9-Ide exhibited substantial selectivity between closely related kinases PKAc and ROCK-II.

The novel high-affinity H9-containing conjugates were subsequently used for the construction of a generic fluorescent probe applicable for the assessment of activity of kinases in a binding assay,<sup>24</sup> or for evaluation of ATP-competitive, protein–substrate competitive, or bisubstrate inhibitors of these kinases. The most potent compounds of the series (**Compounds VI** and **VII**) were used as the major templates, being also more advantageous as compared to H9-Ide containing compounds from the aspect of wider kinase activity profile (as established by displacement assays with PKAc and ROCK). The designed fluorescent probe **Compound XVIII** (also named **ARC-1083**, Fig. 2) contained H9 as the nucleosidic moiety and a *n*-octanoic acid moiety as the first linker, followed by the chiral element (D-arginine), the second linker (6-aminohexanoic acid moiety) and a peptidic fragment containing six D-arginine residues. **Compound XVIII** was synthesized according to the previously reported protocol,<sup>23</sup> with most of the synthesis performed on solid phase (including assembly of the peptidic part, linkers and the chiral spacer, as well as the following reaction with H9 and subsequent protection of the H9 terminal amine by Fmoc-group), with exception of fluorescent dye introduction and the final removal of Fmoc-group, which were performed in solution. Cy3B (ex 559 nm, em 570 nm) was chosen as the fluorescent dye due to its high molar extinction coefficient and high fluorescence quantum yield.<sup>27</sup>

The biochemical evaluation of **Compound XVIII** was performed by titration of the probe with kinases of the AGC-group and using the fluorescence anisotropy (FA) readout for measurements; the previously reported<sup>23</sup> fluorescent probe **ARC-1059** derived from **ARC-903** was used as a reference compound (Table 3). Another parameter determined in this assay was the brightness change *Q* value, representing the ratio of emission intensities of the kinase-bound fluorescent probe to that of the free fluorescent probe; *Q* values were obtained from the fluorescence intensity (FI) curves detected in parallel with FA curves.

Surprisingly, the assay results demonstrated that the increase of number of D-arginine residues in the peptidic part of **Compound XVIII** (i.e., as compared to the starting **Compounds VI** and **VII**) did not change remarkably the affinity of conjugates towards PKAc. Such behavior is different from the results of structure–affinity studies with PKAc for compounds containing an adenosine derivative Adc as the ATP-site targeting fragment<sup>22</sup> (e.g., **ARC-1028** versus **ARC-1012**), and thus probably points to differences in the binding

mode of these two subsets of conjugates towards PKAc (crystallographic evidence would be needed to confirm such hypothesis). The equal affinity of **Compound XVIII** and the previously reported **ARC-1059** towards PKAc ( $K_D = 0.52$  nM) also shows that the introduction of the second linker and the chiral spacer could still not hit the optimal geometry in case of compounds containing H9 as the ATP-site directed fragment and a six D-arginines-containing peptidic moiety. Still, from the aspect of intention to design a generic fluorescent probe for basophilic kinases, **Compound XVIII** proved to be a successful development. **Compound XVIII** possessed subnanomolar  $K_D$  values towards four of the tested kinases (PKAc, ROCK-II, PKC $\delta$ , and PKC $\eta$ ) and low nanomolar  $K_D$  values towards ROCK-I and PKG1 $\alpha$ . Additionally, due to high *Q* values (*Q* > 2) in experiments with PKAc, Akt3, ROCK isoforms, and PKG1 $\alpha$ , **Compound XVIII** can also be used as a fluorescent probe in assays based on detection of fluorescence intensity (FI) change. An analogical FI-assay has been reported for **ARC-1059** with PKG1 $\alpha$ ,<sup>23</sup> whereas the major advantage of FI-assay over FA-assay is that the former does not demand for specific equipment used for FA measurements.

Finally, it was tested whether the structure of 5-isoquinolinesulfonyl derivative used as the ATP-site targeting fragment can influentially drive the selectivity profile of bisubstrate compounds (i.e., upon conjugation with peptides). Thus, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-homopiperazine (HA1077, Fasudil) was conjugated with oligoarginines in order to develop inhibitors possessing higher selectivity towards a pharmacologically important protein kinase ROCK. First of all, an inhibitor **Compound XIX** (Fig. 3) was designed, incorporating Fasudil as the ATP-site targeted fragment and an *n*-octanoic acid moiety as the first linker, followed by a chiral spacer (D-lysine) and the peptidic fragment consisting of two D-arginine residues. The rationale for the choice of the 'shortened' peptidic fragment was the same as previously, keeping in mind the easiness of biochemical evaluation under the non-tight binding conditions.

The profiling of **Compound XIX** in a displacement assay towards a panel of kinases of the AGC-group (Table 4) indicated indeed that **Compound XIX** possessed remarkable selectivity towards ROCK-II. The  $K_d$  values of **Compound XIX** towards other tested kinases were in general over 20-fold higher than the value for ROCK-II, the only exception from the latter trend being the  $K_d$  value of **Compound XIX** towards PKAc (only 3-fold higher). **ARC-903** as the reference compound possessed better affinity towards ROCK-II than **Compound XIX**, but it revealed even better displacement characteristics in assays with PKAc. Additionally, **ARC-903** proved once more its generic character by demonstrating nanomolar  $K_d$  values in assays with PKG1 $\alpha$ , Akt3, and MSK1.

In order to increase further the affinity of **Compound XIX** towards ROCK-II, the peptidic part of the conjugate was elongated to six D-arginine residues instead of two, resulting in the **Compound XX** (also named **ARC-3002**). The luminescent probe **ARC-1063** possessing high affinity towards both PKAc and ROCK-II was used for characterization of **Compound XX** in a displace-

Table 3

Values of dissociation constant ( $K_D$ ) and brightness change upon binding (Q) for **ARC-1059** and **Compound XVIII (ARC-1083)** against kinases of AGC-group

| Protein kinase       | $K_D$ ( <b>ARC-1059</b> ) <sup>d</sup> (nM) | $K_D$ ( <b>Compound XVIII</b> ) <sup>e</sup> (nM) |
|----------------------|---|---|
| Akt3 (PKB $\gamma$ ) | <b>16 [1.2]</b>                             | <b>16 [4.8]</b>                                   |
| MSK1                 | <b>5.3 [0.85]</b>                           | <b>12 [3.5]</b>                                   |
| p70S6K               | <b>11 [4.2]</b>                             | <b>7.0 [3.7]</b>                                  |
| PKAc                 | <b>0.52 [0.17]<sup>b</sup></b>              | <b>0.52 [0.08]</b>                                |
| PKC $\delta$         | <b>nd</b>                                   | <b>0.42 [0.20]<sup>d</sup></b>                    |
| PKC $\eta$           | <b>5.2 [2.20]<sup>d</sup></b>               | <b>0.27 [0.14]<sup>d</sup></b>                    |
| PKG1 $\alpha$        | <b>3.2<sup>b,c</sup></b>                    | <b>1.3 [0.15]<sup>c</sup></b>                     |
| ROCK-I               | <b>nd</b>                                   | <b>1.3 [0.03]</b>                                 |
| ROCK-II              | <b>Below 0.2</b>                            | <b>Below 0.2</b>                                  |
| SGK1                 | <b>nd</b>                                   | <b>28 [10]</b>                                    |

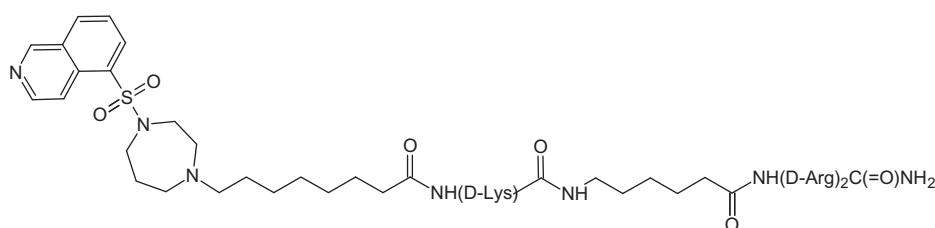
<sup>a</sup>  $K_D$  values measured with binding format of FA assay at 2 nM concentration of fluorescent probe.

<sup>b</sup> Data previously published.<sup>23</sup>

<sup>c</sup>  $K_D$  value determined in the absence of cGMP.

<sup>d</sup>  $K_D$  value determined in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and lipid activator cocktail.

<sup>e</sup>  $K_D$  values measured with binding format of FA-assay at 0.5 nM or 1 nM concentration of fluorescent probe. nd, not determined.



**Figure 3.** Structure of **Compound XIX**.

Table 4

Affinities of **Compound XIX** and reference compounds towards kinases of AGC-group

| Protein kinase       | Log IC <sub>50</sub> (displacement) <sup>a</sup> (nM) |              | K <sub>d</sub> (displacement) <sup>b</sup> (nM) |                  |
|----------------------|---|--------------|---|------------------|
|                      | Compound XIX  | ARC-903      | Compound XIX                                    | ARC-903          |
| Akt3 (PKB $\gamma$ ) | −5.04 [0.11]  | −7.14 [0.13] | <b>7100</b>                                     | <b>55</b>        |
| MSK1                 | −5.34 [0.16]  | −7.09 [0.12] | <b>1600</b>                                     | <b>26</b>        |
| p70S6K               | −5.48 [0.08]  | −8.19 [0.15] | <b>860</b>                                      | <b>Below 1</b>   |
| PKAc                 | −6.16 [0.09]  | −8.26 [0.04] | <b>83</b>                                       | <b>Below 1</b>   |
| PKC $\eta$           | Over −5   | −5.76 [0.04] | <b>nc</b>                                       | <b>980</b>       |
| PKG1 $\alpha$        | −5.73 [0.08]  | −7.38 [0.07] | <b>630</b>                                      | <b>13</b>        |
| ROCK-II              | −6.20 [0.07]  | −8.61 [0.07] | <b>27</b>                                       | <b>Below 0.5</b> |

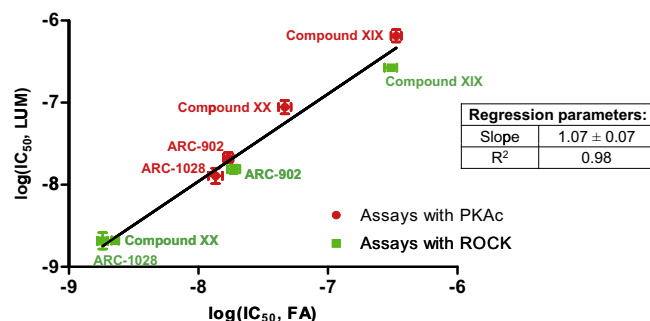
<sup>a</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with FA-assay, displacement of 2 nM fluorescent probe (**ARC-583**, **ARC-1042**, or **ARC-1059**) from its complex with PKs (3 nM PKAc, 3 nM ROCKII, 10 nM p70S6 K, 6 nM PKGIα, 3 nM Akt3, 3 nM PKCη, or 10 nM MSK1).

<sup>b</sup> Displacement constant  $K_d$  values calculated with the aid of online calculator<sup>25</sup> ( $K_D$  values of probes are given in the [Supplementary](#)). nc, not calculated.

ment assay using the FA readout. Moreover, as this probe is also applicable in the so-called LUM-assay,<sup>28</sup> the two assays were performed in parallel and the data from both assays were subsequently correlated (Fig. 4); **ARC-902**, **ARC-1028** and **Compound XIX** were used as the reference compounds.

The data from both assays were well correlated, and **Compound XX** revealed indeed remarkably higher affinity towards ROCK-II than towards PKAc. However, as the displacement  $IC_{50}$  values of **Compound XX** and several reference compounds were in the low nanomolar range (close to the  $K_D$  value of the probe), the  $K_d$  values could not be reliably calculated. Therefore, a modified version of LUM-assay was subsequently used where the luminescent probe was applied at a high concentration as compared to the concentration of the kinase, taking advantage of the fact that the luminescence signal is proportional to the concentration of the kinase-bound probe.<sup>28</sup> The modified LUM-assay enabled avoidance of the tight-binding conditions<sup>29,30</sup> and thus better differentiation of displacement  $IC_{50}$  values for the compounds with high affinity.

The displacement experiments performed with the LUM-assay at the high concentration of the luminescent probe **ARC-1063**



**Figure 4.** Correlation between displacement data obtained from FA-assay and LUM-assay for determination of affinities of **Compound XX (ARC-3002)** and reference compounds towards PKAc and ROCK-II. In case of both assays, displacement of 1 nM fluorescent probe **ARC-1063** from its complex with 2 nM PKAc or 2 nM ROCK-II was performed.

showed that **Compound XX** possessed more than 160-fold higher affinity towards ROCK-II than towards PKAc (Table 5). Therefore,



**Table 5**Affinities of **Compound XX (ARC-3002)** and reference compounds towards PKAc and ROCK-II determined at high concentration of luminescent probe **ARC-1063**

| Code                        | Structure   | Log IC <sub>50</sub> (PKAc) <sup>b</sup> (nM) | K <sub>d</sub> (PKAc) <sup>c</sup> (nM) | Log IC <sub>50</sub> (ROCK-II) <sup>d</sup> (nM) | K <sub>d</sub> (ROCK-II) <sup>c</sup> (nM) | Selectivity index <sup>e</sup> |
|-----------------------------|---|---|---|--|--|--------------------------------|
| <b>ARC-664<sup>a</sup></b>  | AMTH-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> | −6.78 [0.06]                                  | 0.056                                   | −8.56* [0.03]                                    | <b>0.0056*</b>                             | <b>10</b>                      |
| <b>ARC-902<sup>a</sup></b>  | Adc-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>              | −6.12 [0.04]                                  | 0.25                                    | −6.60 [0.06]                                     | <b>1.5</b>                                 | <b>0.17</b>                    |
| <b>ARC-1012<sup>a</sup></b> | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>  | −4.87 [0.03]                                  | 4.5                                     | −6.01 [0.02]                                     | <b>6.4</b>                                 | <b>0.7</b>                     |
| <b>ARC-1028<sup>a</sup></b> | Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>  | −6.12 [0.03]                                  | 0.26                                    | −7.98* [0.05]                                    | <b>0.021*</b>                              | <b>12</b>                      |
| <b>Compound XIX</b>         | Fas-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>  | −4.12 [0.05]                                  | 25                                      | −5.17 [0.04]                                     | <b>45</b>                                  | <b>0.56</b>                    |
| <b>Compound XX</b>          | Fas-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>  | −5.01 [0.02]                                  | 3.3                                     | −7.99* [0.04]                                    | <b>0.020*</b>                              | <b>165</b>                     |
| <b>H89</b>                  |   | −4.30 [0.04]                                  | 17                                      | −5.44 [0.03]                                     | <b>24</b>                                  | <b>0.7</b>                     |
| <b>Fasudil</b>              |   | −4.26 <sup>#</sup> [0.08]                     | 420 <sup>#</sup>                        | −4.93 [0.10]                                     | <b>78</b>                                  | <b>5.4</b>                     |

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c(ARC-1063)}{K_D(ARC-1063)}}$$

<sup>a</sup> Previously published compound.<sup>17,22,34</sup><sup>b</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with LUM-assay by displacement of 30 nM (or <sup>#</sup>2 nM) luminescent probe **ARC-1063** from its complex with 2 nM PKAc.<sup>c</sup> Displacement constant K<sub>d</sub> values calculated with the aid of Cheng–Prusoff equation (see under the table; K<sub>D</sub> values of probe towards PKs are given in the [Supplementary](#)).<sup>d</sup> Logarithms of IC<sub>50</sub> values measured with LUM-assay by displacement of 30 nM (or <sup>\*</sup>100 nM) luminescent probe **ARC-1063** from its complex with 1.5 nM ROCK-II.<sup>e</sup> Index defined as the ratio of K<sub>d</sub> values towards PKAc and towards ROCK-II.

the trend (i.e., increase of affinity of ARCs towards ROCK-II compared to PKAc upon introduction of additional arginine residues) observed in case of compounds containing a H9-Ida fragment was also realized in this case. The K<sub>d</sub> values calculated for **Compound XX** and reference compounds with the usual method (i.e., online calculator) were in very good correlation with the K<sub>d</sub> values obtained from the equation analogical to Cheng–Prusoff equation (where concentration of probe is substituted for concentration of competing substrate and K<sub>D</sub> value of probe for K<sub>m</sub> value of competing substrate).<sup>31–33</sup> Overall, the picomolar K<sub>d</sub> value of **Compound XX** towards ROCK-II and its high selectivity towards ROCK-II versus PKAc feature **Compound XX** as an outstanding ROCK-II inhibitor.

In summary, the present work resulted in the development of new adenosine analogue–oligoarginine conjugates incorporating a 5-isoquinolinesulfonylamide moiety. It was demonstrated that the ATP-site targeting fragment of ARCs as well as the number of arginines in the peptidic part of inhibitors strongly influence both affinity and selectivity properties of ARCs. One of the important achievements of the study was the design of a generic fluorescent probe **Compound XVIII (ARC-1083)** with subnanomolar to low nanomolar dissociation constant values towards several representatives of kinases of the AGC-group. **ARC-1083** was developed on the basis of results of structure–affinity studies of ARCs containing H9 as the ATP-site targeting fragment. Another major result was the construction of **Compound XX (ARC-3002)** incorporating Fasudil as the ATP-site targeting fragment. **ARC-3002** showed a two-digit picomolar displacement constant value for the ROCK-II complex, revealing a 160-fold selectivity compared to closely related PKAc.

## Acknowledgments

The work was supported by grants from the Estonian Science Foundation (8230 and 8419) and the Estonian Ministry of Education and Sciences (SF0180121s08).

## Supplementary data

Supplementary data (structures of the newly synthesized compounds, synthetic procedures, MS and HPLC data, and protocols for biological assays) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.101>.

## References and notes

- Manning, B. D.; Cantley, L. C. *Cell* **2007**, *129*, 1261.
- Shabb, J. B. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2381.
- Chico, L. K.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 892.
- Knight, Z. A.; Lin, H.; Shokat, K. M. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 130.
- Cohen, P. *Biochem. J.* **2010**, *425*, 53.
- Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28.
- Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. *Science* **1800**, 2004, 303.
- Hidaka, H.; Inagaki, M.; Kawamoto, S.; Sasaki, Y. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5036.
- Xu, R.-M.; Carmel, G.; Kuret, J.; Cheng, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 6308.
- Collins, I.; Caldwell, J.; Fonseca, T.; Donald, A.; Bavetsias, V.; Hunter, L.-J. K.; Garrett, M. D.; Rowlands, M. G.; Aherne, G. W.; Davies, T. G.; Berdini, V.; Woodhead, S. J.; Davis, D.; Seavers, L. C. A.; Wyatt, P. G.; Workman, P.; McDonald, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1255.
- Murray, A. J. *Sci. Signal.* **2008**, *1*, re4.
- Ono-Saito, N.; Niki, I.; Hidaka, H. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 123.
- Tamura, M.; Nakao, H.; Yoshizaki, H.; Shiratsuchi, M.; Shigyo, H.; Yamada, H.; Ozawa, T.; Totsuka, J.; Hidaka, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1754*, 245.
- LoGrasso, P. V.; Feng, Y. *Curr. Topics Med. Chem.* **2009**, *9*, 704.
- Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 23.
- Ricouart, A.; Gesquiere, J. C.; Tartar, A.; Sergheraert, C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 73.
- Enkvist, E.; Lavogina, D.; Raidaru, G.; Vaasa, A.; Viil, I.; Lust, M.; Viht, K.; Uri, A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7150.
- Borsi, V.; Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Sarti, N. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4285.
- Stebbins, J. L.; De, S. K.; Pavlickova, P.; Chen, V.; Machleidt, T.; Chen, L. H.; Kuntzen, C.; Kitada, S.; Karin, M.; Pellecchia, M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6206.
- Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **1992**, *258*, 298.
- Watkins, C. L.; Schmaljohann, D.; Futaki, S.; Jones, A. T. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 179.
- Lavogina, D.; Lust, M.; Viil, I.; König, N.; Raidaru, G.; Rogozina, J.; Enkvist, E.; Uri, A.; Bossemeyer, D. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 308.
- Lavogina, D.; Nickl, C. K.; Enkvist, E.; Raidaru, G.; Lust, M.; Vaasa, A.; Uri, A.; Dostmann, W. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 2010, 1804.
- Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 85.
- Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N.; Stuckey, J.; Wang, S. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261.
- Kane, R. S. *Langmuir* **2010**, *26*, 8636.
- Cooper, M.; Ebner, A.; Briggs, M.; Burrows, M.; Gardner, N.; Richardson, R.; West, R. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 145.
- Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1052.
- Kuzmic, P.; Sideris, S.; Cregar, L. M.; Elrod, K. C.; Rice, K. D.; Janc, J. W. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 62.
- Huang, X. J. *Biomol. Screen.* **2003**, *8*, 34.
- Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
- Inglese, J.; Johnson, R. L.; Simeonov, A.; Xia, M.; Zheng, W.; Austin, C. P.; Auld, D. S. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 466.
- Giraldo, J.; Serra, J.; Roche, D.; Rovira, X. *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 197.
- Enkvist, E.; Kriisa, M.; Roben, M.; Kadak, G.; Raidaru, G.; Uri, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6098.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina \_\_\_\_\_ KATRIN KALIND \_\_\_\_\_  
(*autori nimi*)  
(sünnikuupäev: \_\_\_\_\_ 30. detsember 1991. a. \_\_\_\_\_)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

\_\_\_\_\_ ISOKINOLIINIL PÕHINEVAD BISUBSTRAATSED INHIBIITORID \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ PROTEIINKINAASIDELE \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_,  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ Dr Darja Lavõgina, Dr Asko Uri \_\_\_\_\_,  
(*juhendaja nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, \_\_\_\_ 03. juuni 2013. a. \_\_\_\_ (*kuupäev*)